	Спецификации Витального красителя 7-AAD
Форма выпуска	Жидкость
Объем	3 мл
Калибровка	Готов к употреблению
λ возбуждения	488 nM
Пик эмиссии	655 нм (комплекс красителя с двухцепочечной ДНК)

Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток

REF A07704 150 тестов; 3 мл
20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Витальный краситель 7-AAD представляет собой раствор химического соединения, предназначенный для выполнения одно- и многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. При анализе лейкоцитов человека данный краситель позволяет идентифицировать нежизнеспособные клетки и исключить их из интересующей популяции жизнеспособных клеток.

ПРИНЦИП

Данный тест основан на способности 7-амино-актиномицинаD (7-AAD) интеркалировать в двойную спираль ДНК в области последовательных повторов цитозиновых (C) и гуаниновых (G) оснований. Окрашивание происходит при условиях, когда краситель может проникнуть внутрь клетки и связаться с хроматином в ядре. Интактные клетки краситель не окрашивает.

При инкубации образца с красителем 7-AAD происходит окрашивание двойной спирали ДНК. Затем выполняется лизис эритроцитов, а лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Проточный цитофлуориметр измеряет светорассеивание и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на двухпараметрической гистограмме, отображающей светорассеивание в боковом направлении (Side Scatter или SS) и соответствующую 7-AAD флуоресценцию, определяемую с помощью узкополосного фильтра 620 или 675нм. Для гейтирования популяций можно использовать другие двухпараметрические гистограммы в зависимости от используемого приложения.

Чтобы отличить положительно окрашенные (нежизнеспособные) клетки от неокрашенных (жизнеспособных), проводится анализ флуоресценции гейтированных клеток. Результат представляется в виде процентного содержания неокрашенных клеток от всех клеток выбранной популяции.

МЕТОДОЛОГИЯ

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализу жизнеспособных клеток методом проточной цитометрии зачастую мешают клетки, подвергшиеся апоптозу, некрозу и/или поврежденные клетки. Нежизнеспособные клетки можно идентифицировать, поскольку они окрашиваются 7-AAD, в то время как жизнеспособные клетки, у которых целостность мембраны не нарушена, непроницаемы для 7-AAD и не окрашиваются (т.е., такие клетки являются 7-AAD-негативными) ([1]).

Преимущества использования красителя 7-AAD в качестве маркера жизнеспособности клеток хорошо обоснованы в протоколах для обнаружения и подсчета общего количества и/или количества жизнеспособных гемопоэтических клеток-предшественников (2).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
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 микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Данный готовый к употреблению реагент содержит 0,005% (в массо-объемной концентрации) красителя 7-AAD.

   В чистом виде 7-AAD является потенциальным канцерогеном. Хотя вещество сильно разбавлено, оно может сохранять все или часть своих вредоносных свойств. Избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами.

   При использовании реагента необходимо соблюдать меры предосторожности (вчастности, использовать защитные перчатки, халат и очки).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Данный готовый к употреблению реагент содержит 1% (по объему) диметилсульфоксида (ДМСО).

   В чистом виде ДМСО оказывает раздражающее действие. Хотя вещество сильно разбавлено, оно может сохранять все или часть своих вредоносных свойств. Избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами.

   При использовании реагента необходимо соблюдать меры предосторожности (вчастности, использовать защитные перчатки, халат и очки).

8. Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом.
9. Поскольку 7-AAD является хромофором, под действием света происходит его деградация. Для защиты отвоздействия света при хранении 7-AAD упакован во флаконы, непроницаемые для тех длин волн, к которым чувствителен 7-AAD.

   Старайтесь не допускать продолжительного воздействия света на пробы на этапах инкубации и уменьшить воздействие света на образцы после их окрашивания.

10. 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). Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом.
11. 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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

7-AAD Viability Dye	ОСТОРОЖНО!	
	H316	Вызывает незначительное раздражение кожи.
	P332+P313	При раздражении кожи: обратиться к врачу.
		Диметил сульфоксид 0,5 - 1,5%

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

До и после распечатки флакона витальный краситель 7-AAD необходимо хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность красителя в распечатанном флаконе: 60дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть менее 10^4 клеток/мкл (10^{10}/л). При необходимости образец разводят ФСБ, доводя концентрацию лейкоцитов до 5х 10^3 клеток/мкл (5 х 10^9/л).

Для данной процедуры используйте 100мкл образца, предварительно разбавленного впробирке или иным образом.

ЗАМЕЧАНИЕ:

- Для настройки интенсивности флуоресценции, соответствующей 7-AAD, можно окрасить в одной и той же пробирке образец свежей цельной крови и стабилизированных нежизнеспособных клеток (см. рисунок в приложении). При таких условиях напряжение, соответствующее детекции 7-AAD, необходимо скорректировать таким образом, чтобы жизнеспособные клетки (т.е., свежая цельная кровь) располагались в первой декаде нагистограмме, отображающей SS против 7-AAD (см. пример в приложении).
- Во избежание получения ложноположительных результатов при пробоподготовке не используйте реагенты, содержащие вещества, повышающие проницаемость мембраны или фиксирующие вещества.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками объемом 20, 100 и 500мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реагент для лизиса эритроцитов, например IOTest3 Lysing Solution (каталожный номер. A07799).
- Буфер (PBS: 0,01M фосфата натрия; 0,145 M раствор хлорида натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

1. В каждую из пробирок для анализа клинических образцов добавьте по 20мкл раствора красителя 7-AAD.
2. Добавьте 100мкл исследуемого образца (что эквивалентно примерно $5x10^5$клеток).

   Осторожно встряхивают пробирки на приборе Wortex.
3. Инкубируют в течение 15–20 мин при комнатной температуре (18–25°C) в защищенном от света месте.
4. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, следуя рекомендациям изготовителя лизирующего реагента.

   Например, при использовании раствора для лизиса IOTest3 Lysing Solution (каталожный номер. A07799) добавьте к образцу 2мл рабочего раствора (1X), после этого незамедлительно перемешайте на вортексе и инкубируйте втечение 10минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

   Если образец не содержит эритроцитов, не проводите лизис, но добавьте от 0,5 до1мл PBS.
5. Готовые пробы необходимо проанализировать в течение 1часа.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

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 10здоровых взрослых людей сиспользованием вышеописанного реагента. В следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий с использованием 7-AAD (неживые лейкоциты, т.е., положительные по 7-AAD)

Целевая популяция лейкоцитов	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
7-AAD^+	10	7,67	7,54	98

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Актиномицины являются активными биологическими компонентами хромофора (2-амино-4,6 диметил-феноксазона-3) и циклических пентапептидов(3). Они являются антибиотиками бактериального происхождения, которые были впервые обнаружены в почвенных аскомицетах. Актиномицины образуют стабильные комплексы с двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), но необразуют подобные комплексы сдвухцепочечной рибонуклеиновой кислотой (РНК), гибридами РНК-ДНК, и одноцепочечными ДНК или РНК.

7-амино-актиномицинD (7-AAD) представляет собой аналог актиномицина, содержащий аминогруппу в 7положении хромофора. 7-AAD встраивается в ДНК между азотистыми основаниями цитозином и гуанином (4).

Спектральные характеристики 7-AAD позволяют успешно использовать его впроточной цитометрии (3). Комплекс 7-AAD/ДНК эффективно возбуждается голубым лазером с длиной волны 488 нм, в частности аргоновым лазером, которым оснащены некоторые цитометры (5). Пик эмиссии в темно-красной области (от 635до675нм) комплекса 7-AAD/ДНК позволяет оптимально использовать такой флуоресцентный зонд в комбинации сантителами, конъюгированными сфлуоресцина изотиоцианатом (FITC) и сфикоэритрином R (PE) (3). В отличие от пропидиума иодида (PI), который также является флуоресцентным зондом, используемым как маркер для ДНК, спектр эмиссии комплекса 7-AAD/ДНК имеет меньшие области перекрывания со спектрами эмиссии флуорохромов FITC и PE.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание окрашенных клеток (стабилизированные контрольные клетки Stem-Trol, 7-AAD-положительные) на образце свежей цельной крови с положительными клетками целевой популяции. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены вследующей таблице:

Целевая популяция клеток линии Stem-Trol	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
7-AAD^{+}	12	3,63	0,55	15,2

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны вразличных пропорциях контрольные клетки Stem-Trol (стабилизированные контрольные клетки, положительные по7-AAD) и клетки линии KG-1a в (свежая культура, т.е. 7-AAD-отрицательная). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение контрольных клеток Stem-Trol и клеток линии KG-1a изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
7-AAD	Y=1,0278X+4,1364	0,9704

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. 7-AAD, активное вещество данного реагента, было оптимизировано дляполучения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго соблюдать соотношение между объемом реагента и объемом образца.
5. В случае лейкоцитоза образец следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5 x 10^9 лейкоцитов в 1 л.
6. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатия, лизис эритроцитов может происходить медленно, неполностью или совсем непроисходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фикола).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	cMPO	cCD79a	cCD3
Клон	CLB-MPO-1	HM47	UCHT1
Гибридома	SP2/0 x CAF	NS1 x balb/c	NS1 x balb/c
Иммуноген	Purified myeloperoxydase	Synthetic peptide (amino acids 22 - 216) of human mb-1 protein containing the cytoplasmic portion	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1, Kappa	IgG1, Kappa
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)	R-фикоэритрин-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Ig: 3,5-5,0	PE / Ig : 0,5-1,5	ECD / Ig: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
cMPO-FITC / cCD79a-PE / cCD3-ECD

REF A07705

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Реагент позволяет определять внутриклеточную экспрессию молекул миелопероксидазы (МПО), CD79a и CD3 в лейкоцитах.

ПРИНЦИП

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, экспрессируемыми лейкоцитами на внутренней поверхности плазматической мембраны, в цитоплазме или в ядре.

После фиксации/пермеабилизации мембраны происходит специфическое окрашивание лейкоцитов при инкубации образца с реагентом IOTest 3. Затем проводится анализ лейкоцитов 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 (из трех в смеси), соответствующую наиболее интенсивному окрашиванию.

Выделенная таким образом экспрессия популяции клеток двух других маркеров анализируется затем 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 КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Одновременный анализ внутриклеточной экспрессии антигенов МПО, CD79a и CD3 помогает выявить и дифференцировать острые злокачественные заболевания крови, поражающие миелоидные (MPO+ cCD79a$^-$ cCD3$^-$), B-лимфоидные (MPO$^-$ cCD79a+ cCD3$^-$) и T-лимфоидные (MPO$^-$ cCD79a$^-$ cCD3+) линии клеток (1). Данный реагент выявляет молекулы CD3 на поверхности и в цитоплазме окрашенных клеток.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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.

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Образцы подлежат анализу в течение 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Наборы реагентов для компенсации цвета: CYTO-COMP (каталожный номер 6607021 и 6607023).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

  - Реагент для фиксации/пермеабилизации IntraPrep (№ A07802 или A07803).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Следующий негативный контроль IOTest 3: Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (каталожный номер A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

Процедура ПРИМЕЧАНИЕ:
Для пробоподготовки рекомендуется использовать реагент “IntraPrep Fixation/Permeabilization reagent” (каталожный номер: A07802 или A07803).

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07732).

Для образца крови оптимальное окрашивание достигается при концентрации лейкоцитов 3 - 10 x 10^3 кл/мкл. Если концентрация клеток выше 10 x 10^3 кл/мкл, то разведите образец. При работе с клеточной суспензией оптимальное окрашивание достигается при концентрации 5 x 10^3 кл/мкл, разведите образец если необходимо.

1. Добавьте 50 мкл крови, отобранной с ЭДТА или 5 x 10^5 клеток в 2 пробирки (одна тестовая и одна контрольная).
2. Добавьте в каждую пробирку 100 мкл реагента 1 (Fixation) набора IntraPrep.
3. Тщательно перемешайте пробирки на вортексе (3-5 секунд).
4. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
6. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.

   Удаляют супернатант аспирацией.
7. Добавьте 100 мкл реагента 2 (Permeabilization) набора IntraPrep. Дайте смешаться путем диффузии. ВОРТЕКС НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ.
8. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре без встряхивания.
9. Осторожно встряхните пробирки вручную в течение 2-3 секунд.
10. Добавьте 20 мкл раствора конъюгатов антител IOTest 3 в пробирку для анализа клинических образцов. Добавьте 20 мкл отрицательного контроля в пробирку для анализа контролей. Аккуратно перемешайте на вортексе.
11. Инкубируйте 15-20 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
12. Добавьте 4 мл буфера (PBS) и отцентрифугируйте при 150 x g в течение 5 минут при комнатной температуре.
13. Удалите супернатант посредством аспирации и ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5-1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution с рабочей концентрацией (1X) (каталожный номер: A07800).
14. Препараты готовы для цитометрического анализа

ПРИМЕЧАНИЕ. Если препараты будут храниться перед цитометрическим анализом менее 24 ч., рекомендуется хранить их при температуре 2–8°C, защищая от света.

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
cCD79a+	50	11,9	5,3	44,2
cCD3+	50	68,9	11,9	17,3

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
cMPO+	50	99,3	1,1	1,2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Миелопероксидаза (МПО) — это внутриклеточный фермент, экспрессируемый на ранней стадии дифференциации миелоидной линии клеток. МПО синтезируется главным образом при формировании промиелоцитов, на стадии образования азурофильных гранул (или первичных гранул) (2,3,4). МПО является основным компонентом азурофильных гранул полиядерных нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов. МПО не экспрессируется ни лимфоцитами, ни эритроцитами (4,5,6).

Моноклональные антитела CLB-MPO-1 распознают МПО, а также предшественника МПО (про-МПО, неактивную форму фермента).

Молекула CD79a является частью дисульфидносвязанного гетеродимера CD79a/CD79b, нековалентно прикрепленная к поверхности иммуноглобулинов для формирования рецепторов B-клеток. (BCR) (7). Экспрессия CD79b имеет место на ранних стадиях B-клеточного онтогенеза, и таким образом цитоплазматическую локализацию на стадии pro B. Позже CD79a формирует часть BCR. Мембранная экспрессия сохраняется вплоть до плазмоцитоидной стадии, на которой локализация вновь становится цитоплазматической (8).

Моноклональные антитела HM47 реагируют с внутрицитоплазматическим эпитопом молекулы CD79a (8). CD79a был присвоен им на 5-м совещании по антигенам дифференцировки человека, состоявшемся в 1993 году в Бостоне, США (WS Code: cB017, Section B) (8).

Антиген CD3 представляет собой комплекс, сформированный из 5 инвариантных полипептидных цепей (γ, δ, ε, ζ и η), каждая с молекулярным весом от 20 до 25 кДа, и γ-цепи рецепторов постоянного участка (Fc) иммуноглобулинов (FcγR). Антиген CD3 экспрессируется на Т-лимфоцитах и на субпопуляции тимоцитов (9). Примерно 67−76% лимфоцитов периферической крови имеют фенотип CD3+, и доля этих клеток изменяется с возрастом, так, например, у маленьких детей содержание CD3+ клеток меньше (10).

Моноклональные антитела UCHT1 распознают ε цепочку CD3, как на поверхности мембраны (11), так и внутри цитоплазмы (cCD3) (12,13). На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что эти антитела направлены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре в одном образце определялось процентное содержание субпопуляций лимфоцитов. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующих таблицах:

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
cCD79a+	12	19,6	1,1	5,8
cCD3+	12	73	1,2	1,6

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
cMPO+	12	99,7	0,1	0,1

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом для каждого маркера были выбраны клетки двух линий, положительной и отрицательной. Эти линии клеток были смешаны в различных пропорциях; общее количество клеток в образце оставалось постоянным; соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
cMPO	Y = 0,99 X - 0,26	0,999
cCD79a	Y = 0,99 X + 0,80	0,999
cCD3	Y = 0,99 X + 0,71	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. В случае лейкоцитоза кровь следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5 x 10^9 лейкоцитов в 1 л.
5. 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(16).
6. 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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	Kappa chain	Lambda chain	CD19
Клон	Polyclonal	Polyclonal	J3-119
Гибридома	Not applicable	Not applicable	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Light polyclonal Kappa chains	Light polyclonal Kappa chains	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	F(ab')2	F(ab')2	IgG1
Вид	Кролик	Кролик	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 1,9 - 3,3	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Anti-Kappa-FITC / Anti-Lambda-PE / CD19-ECD

REF A07706

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромами, может использоваться для мультипараметрического анализа с помощью проточной цитометрии. Она позволяет обнаруживать экспрессию антигена CD19 и легких каппа- и лямбда-цепей иммуноглобулинов на поверхности лейкоцитов человека.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD19. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Отношение числа клеток, экспрессирующих каппа-цепи, к числу клеток, экспрессирующих лямбда-цепи (соотношение каппа / лямбда), позволяет отличить вторичный гиперлимфоцитоз от лимфопролиферативных синдромов. Во вторичных популяциях В-клеток соотношение каппа / лямбда находится в пределах от 1/1 до 2/1, в то время как для клональной пролиферации В-клеток оно обычно больше 3/1 или ментше 1/2 (1).

Анализ моноклональности В-клеток помогает диагностировать следующие заболевания: хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфома, пролимфоцитарный лейкоз, лимфома из мантийных клеток, фолликулярная лимфома и лифмома маргинальной зоны, а также волосковоклеточный лейкоз (2,3,4,5,6,7).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
– Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (Ref. A07730) или
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

Процедура ПРИМЕЧАНИЕ:
ПРИМЕЧАНИЕ: Для уменьшения уровня неспецифической фиксации, которую вызывает избыток циркулирующих иммуноглобулинов, каждый анализируемый образец необходимо предварительно отмыть (шаги 1 – 3).

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07730 или A07732).

1. Вносят по 100 мкл цельной крови, забранной в ЭДТА (или 5 x 10^5 клеток), в две пробирки (тест-пробирку и контрольную пробирку).
2. Добавляют по 3 мл ФСБ в каждую пробирку и энергично встряхивают на вортексе в течение 3 – 5 секунд.
3. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре (18 – 25°C), затем удаляют супернатант аспирацией.
4. Лизируют эритроциты добавлением 2 мл лизирующего реактива IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799) в рабочем разведении (1X). Немедленно встряхивают на вортексе, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре. Затем удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 3 мл ФСБ.
6. Повторно центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре. Затем удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 100 мкл ФСБ.
7. Добавляют 20 мкл раствора специфического конъюгированного антитела IOTest 3 в тестовую пробирку.
8. Добавляют 20 мкл отрицательного контроля в контрольную пробирку. Осторожно встряхивают пробирки.
9. Инкубируйте 15-20 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
10. Добавляют 3 мл ФСБ и центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
11. Удаляют супернатант аспирацией.

    ПРИМЕЧАНИЕ. Если препараты будут храниться перед цитометрическим анализом менее 24 ч., или если они требуют фиксации, рекомендуется выполнить шаги 12 – 15. В противном случае выполняйте описанные ниже шаги 16 и 17.
12. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
13. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
14. Удалите супернатант посредством аспирации и ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5-1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution с рабочей концентрацией (1X) (каталожный номер: A07800).
15. **ПРИМЕЧАНИЕ.** Если препараты будут храниться перед цитометрическим анализом менее 24 ч., рекомендуется хранить их при температуре 2–8°C, защищая от света.
16. Ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл ФСБ без формальдегида.
17. Во всех случаях препараты следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

    ВНИМАНИЕ: Приготовленные таким образом пробирки готовы для цитометрического анализа, однако их нельзя хранить более чем 2 часа при температуре от 2 до 8°C.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

В следующей таблице представлены средние значения для интересующих субпопуляций лейкоцитов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19+	50	8,63	3,21	37,2

Лимфоциты CD19+	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Kappa+	50	61,77	6,34	10,3
Lambda+	50	37,58	6,23	16,6

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Анти-каппа поликлональные антитела распознают легкую каппа-цепь иммуноглобулинов, экспрессированную на поверхности клеточной субпопуляции, составляющей примерно 2/3 зрелых В-лимфоцитов периферической крови. Эта легкая цепь также обнаруживается на поверхности субпопуляции незрелых В-лимфоцитов костного мозга (8).

Анти-лямбда поликлональные антитела распознают легкую лямбда-цепь иммуноглобулинов, экспрессированную на поверхности клеточной субпопуляции, составляющей примерно 1/3 зрелых В-лимфоцитов периферической крови. Эта легкая цепь также обнаруживается на поверхности субпопуляции незрелых В-лимфоцитов костного мозга (8).

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-клеток, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. Утрата экспрессии CD19 происходит при дифференцировке В-лимфоцитов в плазмоциты (8,10,11). Молекула CD19 не экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками, моноцитами и гранулоцитами (11).

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 (12,13).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания положительных клеток в целевой популяции (смесь клеток линий). Полученные

Смесь NAMALWA + DAUDI	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Kappa+	12	54,37	0,38	0,7
Lambda+	12	45,81	0,3	0,7
CD19+	12	99,81	0,03	0,0

Линейность

Чтобы проверить линейность зависимости интенсивности окрашивания от специфичности реактива, клетки «положительной» линии (DAUDI для каппа-цепи, NAMALWA для лямбда-цепи и CD19) и клетки «отрицательной» линии (HPBALL) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
Kappa	Y = 0,94 X + 1,40	0,998
Lambda	Y = 0,94 X + 0,70	0,999
CD19	Y = 0,95 X + 0,11	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(15).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD5	CD10	CD19
Клон	BL1a	ALB1	J3-119
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from the human thoracic duct	Human leukaemic cells	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	IgG2a, к	IgG1, к	IgG1, к
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,0 – 6,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD5-FITC / CD10-PE / CD19-ECD

REF A07707

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD5, CD10 и CD19 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD19. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Одновременный анализ антигенов CD5, CD10 и CD19 полезен в дифференциальной диагностике различных В-клеточных новообразований (1), таких как В-клеточный хронический лимфолейкоз и лимфома из малых лимфоцитов, характеризующихся фенотипом CD5+CD10$^-$CD19+, и фолликулярная лимфома, которая имеет фенотип CD5$^-$CD10+CD19+ (2,3). Использование такой комбинации антител позволяет также отличить В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) и пре-В-клеточный вариант ОЛЛ (пре-В-ОЛЛ), которые характеризуются фенотипом CD5$^-$CD10+CD19+, от пролимфоцитарного лейкоза с фенотипом CD5$^-$CD10$^-$CD19+ (2). Наконец, по разнице в экспрессии маркера CD20 можно дифференцировать гематогоны (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) (2).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (Ref. A07730) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

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 (эквивалентно приблизительно 5×10^5 клеток). 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5+	50	74,11	7,24	9,77
CD10+	50	2,52	3,19	127
CD19+	50	9,73	4,48	46

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10+	50	3,57	1,86	52

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10+	50	95,01	3,42	3,6

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов, большинстве тимоцитов и на субпопуляции В-лимфоцитов (4,5,6). CD5 не экспрессируется на гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (6). На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела BL1a направлены против CD5 (Code WS: 520, Section T) (4,5).

Молекула CD10 представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярной массой 100 кДа (7,8,9). Изначально, молекула CD10, именуемая также CALLA (общий антиген ОЛЛ), была описана как антиген, специфический для большинства злокачественных гематологических заболеваний (10). 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) (8). Антиген CD10 экспрессируется на ранних стадиях у лимфоидных клеток-предшественников, которые еще не коммитированы в направлении В- или Т-клеточной дифференцировки. У В-клеток экспрессия CD10 прекращается с появлением поверхностных иммуноглобулинов и возобновляется у активированных В-клеток или на стадии пролиферации (7,8,9). Коммитирование лимфоидных клеток-предшественников в направлении Т-клеточной дифференцировки сопровождается утратой экспрессии CD10 (7,8,9). Моноклональные антитела ALB1 распознают молекулу CD10 (10).

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-клеток, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. Утрата экспрессии CD19 происходит при дифференцировке В-лимфоцитов в плазмоциты (,12,13). Молекула CD19 не экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками, моноцитами и гранулоцитами (13).

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 (14,15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, экпрессирующих эти три маркера (смесь линий MOLT4 и RAMOS). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Смесь MOLT4 + RAMOS	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5+	12	36,06	0,52	1,44
CD10+	12	64,22	0,58	0,9
CD19+	12	63,68	0,56	0,88

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом две линии клеток — MOLT4 [CD5+CD10$^-$CD19$^-$] и RAMOS [CD5$^-$CD10+CD19+] — были смешаны в различных пропорциях. Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Отношение MOLT4/RAMOS в смеси изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD5	Y = 1,00 X + 0,89	0,999
CD10	Y = 1,00 X - 0,52	0,999
CD19	Y = 0,99 X - 0,36	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(17).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD20	CD10	CD19
Клон	B9E9 (HRC20)	ALB1	J3-119
Гибридома	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from the human thoracic duct	Human leukaemic cells	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	IgG2a, к	IgG1, к	IgG1, к
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,5 - 6,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD20-FITC / CD10-PE / CD19-ECD

REF A07708

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

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

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD19. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 гематогоны (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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (Ref. A07730) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07730 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

– 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 до 24 часов;

– в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD20+	50	7,37	3,17	43
CD10+	50	1,5	2,14	143
CD19+	50	7,38	3,16	43

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10+	50	3,86	2,15	56

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10+	50	95,31	3,56	3,73

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).

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (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

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной 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

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	FMC7	CD23	CD19
Клон	FMC7	9P25	J3-119
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human B HRIK lymphoblastoid cells	EBV modified lymphoblastoid cells	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	IgGM	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: Available upon request	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Anti-FMC7-FITC / CD23-PE / CD19-ECD

REF A07709

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов FMC7, CD23 и CD19 на лейкоцитах.

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD19. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Одновременный анализ антигенов FMC7, CD23 и CD19 полезен для характеристики хронических В-лимфоидных лейкозов и мелкоклеточных лимфом, имеющих фенотипы FMC7–CD23+CD19+ FMC7dimCD23+CD19+ соответственно (1). При этом лимфомы из мантийных клеток и волосковоклеточные лейкозы характеризуются фенотипом FMC7+CD23–CD19+ (2,3,4,5).

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (Ref. A07730) или

Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07730 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

– 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 до 24 часов;

– в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
FMC7+	50	9,30	5,18	56
CD23+	50	7,55	4,13	55
CD19+	50	9,74	4,77	49

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD23+	50	6,43	6,03	94

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген, распознаваемый моноклональным антителом (мАт) FMC7, представляет собой трансмембранный гликопротеид с молекулярным весом 104 кДа (6,7).

Специфичность мАт 9P25 в отношении CD23 была установлена в 1996 г. VI Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Кобэ, Япония (код WS: CD23.1, раздел B) (8,9,10).

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 (11,12).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 (лимфоциты). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
FMC7+	12	11,49	1,16	10,12
CD23+	12	7,03	0,70	10,02
CD19+	12	12,04	1,22	10,15

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
FMC7	Y = 0,93 X + 3,42	0,998
CD23	Y = 0,97 X + 1,99	0,999
CD19	Y = 0,97 X + 1,58	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(14).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD5	CD23	CD19
Клон	BL1a	9P25	J3-119
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from the human thoracic duct	EBV modified lymphoblastic line	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,0 – 6,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD5-FITC / CD23-PE / CD19-ECD

REF A07710

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD5, CD23 и CD19 на лейкоцитах.

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD19. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Коэкспрессия антигенов CD5 и CD19 позволяет отличить В-клеточные лимфопролиферативные заболевания (CD5+ CD19+) от Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний ($CD5+CD19^-$) (1,2).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 полезен в дифференциальной диагностике различных В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, таких как В-клеточный хронический лимфолейкоз и лимфома из малых лимфоцитов, характеризующихся фенотипом CD5+CD23+CD19+, и лимфома из зоны мантии, которая имеет фенотип $CD5+CD23^-CD19+$ (1,2,3,4,5,6).

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).

– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:

Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (Ref. A07730) или

Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07730 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца (эквивалентно приблизительно 5 × 10^5 клеток). 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5+	50	73,32	7,73	11
CD23+	50	7,70	4,05	53
CD19+	50	9,92	4,65	47

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD23+	50	6,34	5,66	89

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов, большинстве тимоцитов и на субпопуляции В-лимфоцитов (7,8,9). CD5 не экспрессируется на гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (9). На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (3rd HLDA Workshop), проходившей в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела BL1a направлены против CD5 (Code WS: 520, Section T) (7,8).

Антиген CD23 экспрессируется в основном на В-лимфоцитах и моноцитах. Он также присутствует на многих других клетках, в том числе Т-лимфоцитах, эозинофилах, нейтрофилах, тромбоцитах, клетках Лангерганса и субпопуляции эпителиальных клеток тимуса. Экспрессия CD23 усиливается во время активации В-лимфоцитов и утрачивается во время их дифференцировке в плазмоциты (10,11).

На шестой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (6th HLDA Workshop), проходившей в Кобе, Япония, в 1996 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 9P25 направлены против CD23 (WS Code: CD23.1, Section B) (12).

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-клеток, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. Утрата экспрессии CD19 происходит при дифференцировке В-лимфоцитов в плазмоциты (,14,15). Молекула CD19 не экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками, моноцитами и гранулоцитами (15).

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 (16,17).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5+	12	70,78	0,42	0,60
CD23+	12	7,91	0,27	3,43
CD19+	12	13,01	0,33	2,53

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD5	Y = 0,99 X + 0,34	0,999
CD23	Y = 0,99 X + 0,33	0,999
CD19	Y = 0,98 X + 1,22	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(19).
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD25	CD11c	CD19
Клон	B1.49.9	BU15	J3-119
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human alloactivated T lymphocytes (FC2)	Synovial fluid dendritic cells	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 7,5 – 9,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD25-FITC / CD11c-PE / CD19-ECD

REF A07711

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD25, CD11c и CD19 на лейкоцитах.

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD19. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии антигенов CD25, CD11c и CD19 полезен для диагностики волосатоклеточных лейкозов, для которых характерна коэкспрессия этих антигенов (1,2,3,4). Несмотря на то, что экспрессия CD11c не является специфической для волосатоклеточных лейкозов, экспрессия CD25 и CD11c при отсутствии экспрессии CD23 и CD5, может служить подтверждением диагноза (1,5). Подобный дополнительный анализ может быть выполнен с помощью следующего реагента IOTest 3: CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD (каталожный номер A07710).

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:

Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (Ref. A07730) или

Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

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.

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07730 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл исследуемого образца крови с ЭДТА (или приблизительно 5×10^5 клеток). Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD25+	50	8,78	3,76	43
CD11c+	50	20,54	6,51	32
CD19+	50	9,20	4,26	46

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c+	50	95,04	2,68	3

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c+	50	98,76	1,81	2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD25, носящая название Tac-антиген, представляет собой α-цепь рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2Rα), трансмембранный гликопротеин с молекулярным весом 55 кДа (6). Высокоаффинный рецептор к ИЛ-2 состоит из трех цепей: α (IL-2Rα, Tac, p55 или CD25), β (IL-2Rβ, p75 или CD122) и γ (IL-2Rγ, p64 или CD132). Антиген CD25 экспрессируется на циркулирующих CD4+ Т-лимфоцитах и не обнаруживается на циркулирующих CD8+ лимфоцитах (7). Однако при активации все Т-лимфоциты экспрессируют CD25. Субпопуляция В-лимфоцитов (CD20+) экспрессирует антиген CD25. Циркулирующие в крови гранулоциты, моноциты, естественные клетки-киллеры, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют CD25 (6).

На второй Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (2nd HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1984 г., было подтверждено, что моноклональные антитела B1.49.9 направлены против CD25 (Code WS: T141, Section T) (8).

Антиген CD11c (αX-субъединица интегрина/ поверхностный антиген p150) представляет собой трансмембранный протеин I типа, который экспрессируется в основном моноцитами, макрофагами и NK-клетками, и в меньшей степени гранулоцитами, дендритными клетками и некоторыми субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов (9).

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела BU15 направлены против CD11c (WS Code: 256, Section M) (10).

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-клеток, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. Утрата экспрессии CD19 происходит при дифференцировке В-лимфоцитов в плазмоциты (,12,13). Молекула CD19 не экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками, моноцитами и гранулоцитами (13).

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 (14,15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевых популяций, которые экспрессируют эти маркеры (линия клеток FEV20.3 для CD25 и лимфоциты для CD11c и CD19). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Линия клеток FEV20.3	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD25+	12	24,32	0,65	2,7

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c+	12	13,18	0,22	1,7
CD19+	12	8,52	0,22	2,6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD25	Y = 0,97 X + 1,83	0,999
CD11c	Y = 0,99 X + 0,13	0,998
CD19	Y = 0,99 X + 0,91	0,997

ОГРАНИЧЕНИЯ

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(17).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD103	CD11c	CD19
Клон	2G5	BU15	J3-119
Гибридома	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human intestine intra-epithelial lymphocytes	Synovial fluid dendritic cells	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 5,0 – 7,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD103-FITC / CD11c-PE / CD19-ECD

REF A07712

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD103, CD11c и CD19 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD19. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ экспрессии антигенов CD103, CD11c и CD19 полезен при диагностике B-клеточных лейкозов, при которых наблюдается экспрессия этих антигенов (1,2,3,4,5). В частности, экспрессия CD103 считается самым надежным маркером, позволяющим отличить волосатоклеточный лейкоз от других B-клеточных лейкозов (6). Несмотря на то, что экспрессия CD11c не является специфической для волосатоклеточных лейкозов, экспрессия CD25 и CD11c, при отсутствии экспрессии CD23 и CD5, может служить подтверждением диагноза (1,5). Этот дополнительный анализ может быть выполнен с помощью следующих реагентов IOTest 3: CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD (каталожный номер A07710) и CD25-FITC/ CD11c-PE/CD19-ECD (каталожный номер A07711). Наконец, анализ экспрессии антигенов CD103, CD11c и CD19 полезен для диагностики некоторых неходжкинских лимфом (1,6).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD19-ECD (Ref. A07730) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07730 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца (эквивалентно приблизительно 5 × 10^5 клеток). 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Показатели для CD103 не приведены, поскольку лишь небольшая популяция нормальных лейкоцитов (от 0,5 до 5%) экспрессирует антиген CD103.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c+	50	19,57	6,73	34,39
CD19+	50	9,87	4,96	50,24

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c+	50	96,44	2,56	2,65

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c+	50	99,13	0,66	0,67

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD103 (αE-субъединица интегрина/ поверхностный антиген HML-1) представляет собой трансмембранный протеин I типа, который экспрессируется более чем на 90% интраэпителиальных лимфоцитах и примерно на 40% Т-лимфоцитов подслизистого слоя (lamina propria) кишечника (7,8). Его экспрессия обнаруживается на большинстве интраэпителиальных лимфоцитов, присутствующих в других тканях, таких как бронхи, кожа и — при воспалении — в тканях молочной железы, слюнных желез и опухолевого эпителия (7,8). В периферическая крови и периферических лимфоидных органах антиген CD103 экспрессируется на 0,5−5% нормальных лимфоцитов.

На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1993 г., было подтверждено, что моноклональное антитело 2G5 направлено против CD103 (WS Code: A005, Section A; WS Code:29, Section BP) (9).

Антиген CD11c (αX-субъединица интегрина/ поверхностный антиген p150) представляет собой трансмембранный протеин I типа, который экспрессируется в основном моноцитами, макрофагами и NK-клетками, и в меньшей степени гранулоцитами, дендритными клетками и некоторыми субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов (10).

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела BU15 направлены против CD11c (WS Code: 256, Section M) (11).

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-лимфоцитов, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. Утрата экспрессии CD19 происходит при дифференцировке В-лимфоцитов в плазмоциты (12,13,14). Молекула CD19 не экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками, моноцитами и гранулоцитами (14).

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 (15,16).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевых популяций (смесь Control Cells CYTO-TROL (каталожный номер 6604248) + линия клеток человека MOLT16). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

CYTO-TROL смесь + MOLT16	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD103+	12	24,34	0,59	2,4
CD11c+	12	14,98	0,30	2,0
CD19+	12	9,55	0,20	2,1

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были выбраны соответствующие целевые группы. Для CD103 и CD19 — одна пара линий клеток (одна положительная, другая отрицательная): MOLT16 [$CD103^+CD11c^-CD19^-$] и DAUDI [$CD103^-CD11c^-CD19^+$]. Для CD11c — перечисленные выше отрицательные линии клеток и положительная целевая популяция лейкоцитов: гранулоциты [$CD103^-CD11c^+CD19^-$]. Эти популяции клеток были смешаны в различных пропорциях; общее количество клеток оставалось постоянным, и соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD103	Y = 0,97 X + 1,36	0,998
CD11c	Y = 1,01 X + 0,44	0,998
CD19	Y = 0,95 X + 1,71	0,997

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(18).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD19	CD10	CD45
Клон	J3-119	ALB1	J33
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Lymphoma cells SKLY18	Human Leukaemic cells	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,5 – 7,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

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

REF A07713

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD19, CD10 и CD45 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 гематогоны (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).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного контроля.
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца (эквивалентно приблизительно 5 × 10^5 клеток). 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19+	50	9,50	4,30	45
CD10+	50	1,12	0,75	67
CD45+	50	94,63	3,77	4

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10+	50	3,14	2,07	66
CD45+	50	96,31	2,91	3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10+	50	94,53	9,58	10
CD45+	50	99,62	0,53	1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD19 экспрессируется на поверхности всех В-клеток, от ранних пре-В-клеток до зрелых В-лимфоцитов. Утрата экспрессии CD19 происходит при дифференцировке В-лимфоцитов в плазмоциты (,5,6). Молекула CD19 не экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками, моноцитами и гранулоцитами (6).

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 (7,8).

Молекула CD10 представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярной массой 100 кДа (9,10,11). 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 у лимфоидных клеток-предшественников, которые еще не коммитированы в направлении В- или Т-клеточной дифференцировки. У В-клеток экспрессия CD10 прекращается с появлением поверхностных иммуноглобулинов и возобновляется у активированных В-клеток или на стадии пролиферации (9,10,11). Коммитирование лимфоидных клеток-предшественников в направлении Т-клеточной дифференцировки сопровождается утратой экспрессии CD10 (9,10,11). Моноклональные антитела ALB1 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 A, B и C 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 ().

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 (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) ().

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Клеточная линия RAMOS	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19+	12	99,99	0,03	0,03
CD10+	12	99,98	0,04	0,04
CD45+	12	99,99	0,03	0,03

Линейность

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 сописанной 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(17).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (18,19).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD38	CD56	CD45
Клон	T16	N901 (NKH-1)	J33
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	PHA-activated peripheral blood lymphocytes	Human chronic myeloid leukaemia cells (CML)	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,0 – 5,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD38-FITC / CD56-PE / CD45-ECD

REF A07714

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

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

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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).

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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38+	50	33,5	11,8	35
CD56+	50	14,6	6,8	47

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38+	50	94,2	4,3	5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38+	50	99,3	0,9	1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

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

Специфичность мАт N901 (NKH-1) в отношении CD56 была установлена IV Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Вене, Австрия, в 1989 г. (код WS: 9, раздел NL) (7).

Моноклональные антитела J33 окрашивают все изоформы молекулы CD45, поэтому данные антитела считаются панлейкоцитарным маркером. На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия в 1986 г. было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code). 818, Section NL) (8).

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:

положительной линии MO7E	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38	12	100	0,00	0,00
CD56	12	99,8	0,03	0,03
CD45	12	97,8	0,12	0,1

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии MO7E (CD38+ CD56+ CD45+) и клетки отрицательной линии FRN14.33 (CD38− CD56− CD45−). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD38	Y= 0,973 X + 3,25	0,999
CD56	Y= 0,969 X + 1,37	0,999
CD45	Y= 0,962 X + 1,60	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(10).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (11,12).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD14	CD16	CD45
Клон	RMO52	3G8	J33
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human monocytes	Human neutrophils	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 6,5 – 10	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD14-FITC / CD16-PE / CD45-ECD

REF A07715

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD14, CD16 и CD45 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Антиген CD14 обнаруживается на поверхности клеток миело-моноцитарного ряда, коммитированных в направлении дифференцировки в моноциты. Он отсутствует на B- и T-лимфоцитах, NK-клетках (натуральных киллерах), эритроцитах и тромбоцитах (1).

Антиген CD16 является низкоаффинным рецептором для иммуноглобулинов G (IgG) (FcγRIII), экспрессируется на NK-клетках, моноцитах, макрофагах и нейтрофилах (2,3).

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 (4,5).

Данный реагент IOTest 3 применяется для характеристики миелоидных лейкозов. Бластные клетки гранулоцитарного ряда являются отрицательными по антигену CD16 или характеризуются слабой экспрессией данного антигена, тогда как клетки, коммитированные в направлении моноцитарного ряда, имеют фенотип CD14+ (6).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16+	50	10,2	4,4	44

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	50	91,0	6,3	7
CD16+	50	35,04	12,6	36

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	50	98,5	2,2	2,2
CD16+	50	90,2	9,3	10,3

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

На шестой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (6th HLDA Workshop), проходившей в Кобе, Япония, в 1996 г., было подтверждено, что моноклональные антитела RM052 направлены против CD14 (WS Code: MA62, Section M) (7).

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) (8).

Моноклональные антитела J33 окрашивают все изоформы молекулы CD45, поэтому данные антитела считаются панлейкоцитарным маркером. На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия в 1986 г. было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code). 818, Section NL) (9).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре в одном образце определялось процентное содержание окрашенных клеток целевой популяции (моноцитов и гранулоцитов периферической крови). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	12	69	0,75	1,1

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16+	12	98,1	0,16	0,16
CD45+	12	99,9	0,05	0,05

Линейность

Для проверки линейности окрашивания CD14 и CD45 данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии THP1 (CD14+ CD45+) и клетки отрицательной линии FRN14.33 (CD14– CD45–). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Для проверки линейности окрашивания CD16 были смешаны в различных пропорциях клетки цельной крови (CD16+ гранулоциты) и клетки отрицательной линии FRN14.33 (CD16–). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение гранулоцитов и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD14	Y= 0,974 X + 1,26	0,999
CD45	Y = 0,997 X + 0,49	0,999
CD16	Y= 0,989 X - 0,46	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 10^9 лейкоцитов в 1 л.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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(11).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (12,13).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD71	CD33	CD45
Клон	YDJ1.2.2	D3HL60.251	J33
Гибридома	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)	HL60 cell line	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 5,0 – 8,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD71-FITC / CD33-PE /CD45-ECD

REF A07716

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD71, CD33 и CD45 на лейкоцитах.

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии антигена CD45 полезен при фенотипировании лейкозов путем определения бластных клеток на диаграмме, отображающей боковое светорассеивание (Side Scatter) анализируемых клеток и флуоресценцию ECD (1,2,3). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (случаи острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (случаи острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1).

Одновременный анализ экспрессии антигенов CD71 и CD33 применяется для того, чтобы отличить бластные клетки миелоидного ряда (CD71−CD33+) от бластных клеток эритроидного ряда (CD71+CD33−) (1,2,4).

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
– Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих
Поскольку в популяции нормальных лейкоцитов не наблюдается положительное окрашивание по CD71, соответствующие референсные интервалы не определены.

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	95,90	2,86	3

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	95,74	2,45	3
CD33+	10	91,71	4,92	5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	99,84	0,26	0,3
CD33+	10	99,52	0,47	0,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD71, также известный как антиген T9 или рецептор трансферрина, представляет собой трансмембранный гликопротеин. Эта молекула экспрессируется на поверхности клеток-предшественников эритроцитарной линии, на ретикулоцитах и клетках эндотелия сосудов головного мозга (5). CD71 обычно экспрессируется на поверхности всех пролиферирующих клеток, что отражает имеющуюся на данном этапе клеточного цикла потребность в железе (5).

На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1983 г., был проведен анализ моноклональных антител YDJ1.2.2 (WS Code: A006 и BP0111, Section AA6 и BP соответственно) (6).

Антиген CD33 представляет собой трансмембранный мономерный гликопротеин с молекулярным весом 67 кДа. Данная молекула относится к семейству сиалоадгезинов: ее адгезивные свойства зависят от присутствия сиаловой кислоты (7). Молекула CD33 экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками миеломоноцитарного и эритроидного рядов и не экспрессируется клетками лимфоидного ряда (8).

Экспрессия антигена CD33 сильно выражена в моноцитах и слабо выражена в циркулирующих гранулоцитах. На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., был проведен анализ моноклональных антител D3HL60.251 (WS Code: 504, Section M) (7).

Молекула CD45 существует в виде как минимум четырех изоформ, распознаваемых специфическими антителами: CD45RA, CD45RB, CD45RC и CD45R0. Эти изоформы возникают в результате альтернативного сплайсинга трех экзонов одного гена, кодирующего пептиды A, B и C молекулы CD45 (9).

Семейство гликопротеинов CD45, экспрессируемое на поверхности лейкоцитов человека, не обнаруживается на эритроцитах (10). Плотность экспрессии антигена CD45 на лимфоцитах больше, чем на моноцитах или нейтрофилах (11).

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, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code:. 818, Section NL) (12).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, экпрессирующих эти три маркера (клеточная линия MO7E). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клетки линии MO7E	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD71+	12	100	0,00	0,00
CD33+	12	90,67	0,40	0,44
CD45+	12	99,98	0,06	0,06

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD71	Y = 0,95 X + 1,56	0,999
CD33	Y = 0,99 X - 0,33	0,999
CD45	Y = 0,99 X - 0,04	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(14).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (15,16).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD34	CD33	CD45
Клон	581	D3HL60.251	J33
Гибридома	NS0 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	KG1a cell line + human CD34+ leukaemia	HL60 cell line	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,0 – 5,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD34-FITC / CD33-PE / CD45-ECD

REF A07717

25 тестов — 0,5 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD34, CD33 и CD45 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП
Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, которые экспрессируются некоторыми клетками гемопоэтического происхождения.

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 (1,2,3). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (в случае острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (в случае острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1). Одновременный анализ экспрессии антигенов CD34 и CD33 применяется для характеристики бластных клеток миелоидного происхождения: степень их зрелости определяется по экспрессии CD34, а миелоидное происхождение подтверждается коэкспрессией антигена CD33 (4,5,6,7,8).

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
– Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	50	96,31	2,61	3

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD33+	50	93,29	4,63	5
CD45+	50	96,23	3,02	3

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD33+	50	99,64	0,43	0,4
CD45+	50	99,87	0,18	0,2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD34 представляет собой трансмембранный мономерный гликопротеин с молекулярной массой примерно 110 кДа (9,10,11). Он является одним из наиболее ранних маркеров гемопоэтических клеток-предшественников у человека (12,13). Этот антиген экспрессируется почти всеми гемопоэтическими клетками-предшественниками, а также полипотентными стволовыми клетками (14,15,16). Степень экспрессии антигена CD34 более высока в ранних стволовых клетках и снижается по мере коммитирования и созревания гемопоэтических клеток различных линий (14,17). У здоровых людей транзиторная экспрессия CD34 выявляется на очень незначительной части популяции положительных клеток исследуемых образцов. В норме антиген CD34 экспрессируется на поверхности 1−5% клеток костного мозга и пуповинной крови (14) и 0,1−0,5% клеток периферической крови (18).

Экспрессия молекулы CD34 также отмечается на поверхности клеток эндотелия сосудов (19,20) и стромальных клеток (и клеток-предшественников) костного мозга (21).

На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1993 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 581 направлены против CD34 (WS Code: MA027, Section M) (22).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, экспрессирующих эти три маркера (клеточные линии MO7E и KG1A). Измерение выполнялось 12 раз.

Клеточные линии MO7E и KG1A	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD34+	12	68,39	0,44	0,7
CD33+	12	27,05	0,35	1,3
CD45+	12	100,00	0,00	0,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD34	Y = 0,98 X + 1,29	0,999
CD33	Y = 0,99 X + 0,58	0,999
CD45	Y = 0,99 X + 0,75	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(24).
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (25,26).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD34	CD117	CD45
Клон	581	104D2D1	J33
Гибридома	NS0 x Balb/c	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	KG1a cell line + human CD34+ leukaemia	MOLM-1 leukaemic cell line	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,0 – 5,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD34-FITC / CD117-PE / CD45-ECD

REF A07718

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флу о рохромом, предназначена для выполнения много параметрического анализа методом проточной цитометрии. Он позволяет проанализировать экс прессию антигенов CD34,CD117 и CD45 на клетках гемопоэтического происхож дения.

ПРИНЦИП

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, которые экспрессируются некоторыми клетками гемопоэтического происхождения.

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Одновременный анализ антигенов CD34 и CD117 помогает охарактеризовать бластные клетки миелоидного происхождения: степень их зрелости определяется по экспрессии CD34, а миелоидное происхождение подтверждается коэкспрессией антигена CD117 (1,2,3,4,5,6).

Для выделения целевой популяции бластных клеток используется гистограмма Боковое светорассеивание Side Scatter против CD45 (1,2,7). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (в случае острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (в случае острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей.

Поскольку клетки, положительные по CD34 и CD117, редко встречаются в периферической крови, соответствующие референсные интервалы не приведены.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	95,75	3,17	3,3

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	96,69	1,85	1,9

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	99,86	0,15	0,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD34 представляет собой трансмембранный мономерный гликопротеин с молекулярной массой примерно 110 кДа (8,9,10). Он является наиболее часто используемым маркером для идентификации гемопоэтических клеток-предшественников человека (11,12). Этот антиген экспрессируется почти всеми гемопоэтическими клетками-предшественниками, а также полипотентными стволовыми клетками (13,14,15). В норме антиген CD34 экспрессируется на поверхности 1−5% клеток костного мозга и пуповинной крови (13) и 0,1−0,5% клеток периферической крови (16).

Экспрессия молекулы CD34 также отмечается на поверхности клеток эндотелия сосудов (17,18) и стромальных клеток (и клеток-предшественников) костного мозга (19). Моноклональные антитела 581 распознают эпитоп III класса, расположенный в молекуле антигена CD34 (20).

На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1993 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 581 направлены против CD34 (WS Code: MA027, Section M) (20).

Антиген CD117 представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 145 кДа, кодируемый прото онкогеном c kit (21). Среди гемопоэтических клеток-предшественников молекула CD117 экспрессируется на поверхности примерно 50% CD34+ клеток-предшественников эритроцитарного (22), миеломоноцитарного и мегакариоцитарного ряда (23,24). Экспрессия антигена CD117 не обнаруживается на поверхности зрелых гемопоэтических клеток, за исключением тучных клеток.

MAb 104D2D1 было отнесено к CD117 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: C-30. Секция C) (23).

Молекула CD45 экспрессируется на поверхности лейкоцитов человека, но не экспрессируется на зрелых эритроцитах (25). Плотность экспрессии на лимфоцитах больше, чем на моноцитах или нейтрофилах (26).

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, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (27).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, экспрессирующих эти три маркера (клеточные линии KG-1a человека и/или MO7E). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

KG-1a + MO7E	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
KG-1a/CD34$^+$	12	70,31	0,44	0,62
MO7E CD117$^+$	12	26,76	0,4	1,46
KG-1a + MO7E /CD45$^+$	12	99,43	0,09	0,09

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD34	Y = 0,98 X + 0,60	0,999
CD117	Y = 0,93 X + 2,33	0,999
CD45	Y = 0,98 X + 0,84	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(29).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (30,31).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	HLA-DR	CD34	CD45
Клон	Immu357	581	J33
Гибридома	X63 x Balb/c	NS0 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Cell line transformed by EBV	KG1a cell line + human CD34+ leukaemia	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 5,0 – 7,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Anti-HLA-DR-FITC / CD34-PE / CD45-ECD

REF A07719

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов HLA-DR, CD34 и CD45 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 ECD (CD45) (1,2,3). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (в случае острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (в случае острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1). Наконец, коэкспрессия антигенов HLA-DR и CD34 помогает более полно охарактеризовать незрелые бластные клетки (4,5,6,7,8). Для подтверждения миелоидного происхождения анализируемых бластных клеток можно провести дополнительное исследование с использованием следующих реагентов IOTest 3: CD34-FITC / CD33-PE / CD45-ECD (каталожный номер A07717), CD34-FITC / CD117-PE / CD45-ECD (каталожный номер A07718) и HLA-DR-FITC / CD13-PE / CD45-ECD (каталожный номер A07720).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
    Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
    Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Поскольку в популяции нормальных лейкоцитов не наблюдается положительное окрашивание по CD34, соответствующие референсные интервалы не определены.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	50	17,32	9,48	55
CD45+	50	94,63	3,77	4

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	50	91,87	6,29	7
CD45+	50	95,67	2,88	3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	50	99,86	0,17	0

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональные антитела Immu357 распознают эпитоп мономорфного белка HLA-DR с молекулярным весом 29−33 кДа.

На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1993 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 581 направлены против CD34 (WS Code: MA027, Section M) (9).

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 (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, экспрессирующих эти три маркера (клеточные линии человека DAUDI и KG-1a). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клеточные линии DAUDI и KG-1a	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	12	44,65	1,03	2,30
CD34+	12	55,09	1,06	1,92
CD45+	12	99,75	0,05	0,05

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
HLA-DR	Y = 0,97 X + 1,30	0,997
CD34	Y = 0,99 X + 0,22	0,999
CD45	Y = 0,99 X - 0,16	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(12).
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (13,14).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	HLA-DR	CD13	CD45
Клон	Immu357	SJ1D1	J33
Гибридома	X63 x Balb/c	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Cell line transformed by EBV	KG-1 cell line	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 5,0 – 7,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Anti-HLA-DR-FITC / CD13-PE / CD45-ECD

REF A07720

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов HLA-DR, CD13 и CD45 на лейкоцитах.

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 ECD (CD45) (1,2,3). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (в случае острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (в случае острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1). Одновременный анализ экспрессии антигенов HLA-DR и CD13 применяется для характеристики бластных клеток миелоидного ряда: степень их зрелости определяется по экспрессии HLA-DR, а миелоидное происхождение подтверждается коэкспрессией антигена CD13 (4,5,6,7,8).

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
– Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	50	12,82	8,25	64
CD45+	50	93,69	4,44	5

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	50	91,40	9,32	10
CD13+	50	92,69	6,67	7
CD45+	50	93,03	7,05	8

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD13+	50	99,30	0,75	1
CD45+	50	97,88	2,72	3

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональные антитела Immu357 распознают эпитоп мономорфного белка HLA-DR с молекулярным весом 29−33 кДа.

Моноклональные антитела SJ1D1 взаимодействуют с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами периферической крови. На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела SJ1D1 направлены против CD13 (WS Code: 285, Section M) (9).

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, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, экспрессирующих эти три маркера (клеточные линии человека DAUDI и KG-1a). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клеточные линии DAUDI и KG-1a	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	12	42,27	1,22	2,89
CD13+	12	58,51	1,16	1,99
CD45+	12	99,93	0,09	0,09

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
HLA-DR	Y = 0,98 X + 0,40	99,88
CD13	Y = 0,97 X + 1,26	99,97
CD45	Y = 0,99 X - 0,11	99,98

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(12).
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (13,14).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD15	CD33	CD45
Клон	80H5	D3HL60.251	J33
Гибридома	MOPC.315-43 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human granulocytes	HL60 cell line	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgM	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 12 – 14	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD15-FITC / CD33-PE / CD45-ECD

REF A07721

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD15, CD33 и CD45. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом проточной цитометрии.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ экспрессии антигена CD45 полезен при фенотипировании лейкозов путем определения бластных клеток на диаграмме, отображающей боковое светорассеивание (Side Scatter) анализируемых клеток и флуоресценцию ECD (1,2,3). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (случаи острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (случаи острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1).

Одновременный анализ экспрессии антигенов CD33 и CD15 полезен для характеристики бластных клеток миелоидного ряда (в случае острого миелобластного лейкоза, ОМЛ, который по классификации FAB дифференцируется по стадиям от M1 до M5): по экспрессии маркера CD15 более точно определяется субпопуляция гранулоцитов (2,4,5).

Более того, аберрантная экспрессия антигена CD15 (в отсутствие CD33) может отмечаться в случаях острого лимфобластного лейкоза из ранних В-клеток-предшественников (про-В-ОЛЛ), связанного с транслокацией 11q23 (6).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного контроля.

   В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца (эквивалентно приблизительно 5 × 10^5 клеток). Аккуратно перемешайте на вортексе.
2. Инкубируйте в течение 15−20 минут при комнатной температуре (18−25°C) в защищенном от света месте.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	94,93	7,4	7,8

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD15+	10	93,03	8,8	9,5
CD33+	10	91,91	9,5	10,3
CD45+	10	93,03	8,8	9,5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD15+	10	97,79	2,3	2,3
CD33+	10	98,47	1,4	1,4
CD45+	10	97,79	2,3	2,3

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула адгезии CD15 представляет собой углеводный антиген, известный также как антиген Льюиса x (Lex), гликолипид лакто-N-фукопентоза III, X-гаптен и SSEA-1 (стадиеспецифичный эмбриональный антиген 1) (7). В процессе гемопоэза молекула CD15 экспрессируется на миелоидных клетках-предшественниках (7). Она экспрессируется на зрелых клетках миеломоноцитарного ряда (в том числе на моноцитах-макрофагах, нейтрофилах, эозинофилах, тучных клетках и на клетках Лангерганса) (7,8). Молекула CD15 не экспрессируется на эритроцитах, тромбоцитах и лимфоцитах периферической крови (9).

Моноклональное антитело 80H5 распознает глюкозо-подобную последовательность лакто-N-фукопентозы III (Lex) и не распознает изоформу CD15s, состоящую из остатков сиаловой кислоты (7). На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1993 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 80H5 направлены против CD15 (WS Code: MA001, section M) (7).

Антиген CD33 представляет собой трансмембранный мономерный гликопротеин с молекулярным весом 67 кДа. Данная молекула относится к семейству сиалоадгезинов: ее адгезивные свойства зависят от присутствия сиаловой кислоты (10). Молекула CD33 экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками миеломоноцитарного и эритроидного рядов и не экспрессируется клетками лимфоидного ряда (11). Экспрессия CD33 сильно выражена на моноцитах и слабо выражена на циркулирующих гранулоцитах.

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., было подтверждено, что моноклональные антитела D3HL60.251 направлены против CD33 (WS Code: 504, Section M) (10).

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 A, B и C молекулы CD45 (12). Семейство гликопротеинов CD45, экспрессируемое на поверхности лейкоцитов человека, отсутствует на поверхности эритроцитов (13). Плотность экспрессии антигена CD45 на лимфоцитах больше, чем на моноцитах, а на моноцитах, в свою очередь, больше, чем на поверхности нейтрофилов ().

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 (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялась средняя интенсивность флуоресценции (MFI) положительных клеток целевой популяции (клеточной линии U937), экспрессирующих эти три маркера. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клеточная линия U937	Номер	Средняя величина (СИФ)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD15+	12	141,1	2,1	1,5
CD33+	12	86,0	1,2	1,4
CD45+	12	40,0	0,5	1,1

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии U937 (CD15+ CD33+ CD45+) и клетки отрицательной линии FRN14.33 (CD15– CD33– CD45–). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение U937 / FRN14.33 в смеси изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD15	Y = 0,98 X + 1,02	0,999
CD33	Y = 0,99 X + 0,42	0,999
CD45	Y = 0,99 X + 0,60	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(16).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (17,18).
9. Известно, что моноклональные антитела к антигену Льюиса (CD15) индуцируют агрегацию клеток миеломоноцитарного происхождения (19,20).

Такие агрегаты клеток могут не попасть в гейты интересующей популяции клеток, что может привести к неточному подсчету CD15-положительных клеток. Поскольку для выявления агрегатов клеток предпочтительнее использовать сигнал бокового светорассеяния в логарифмической шкале (SS Log), рекомендуется при анализе образца использовать отрицательный контроль, например Neg.Ctrl-FITC/Neg.Ctrl-PE/CD45-ECD (каталожный номер A07730). При окрашивании образца негативным контролем агрегаты клеток образовываться не будут, и полученную с его помощью гистограмму SS Log - CD45-ECD следует сравнить с аналогичной гистограммой, полученной при окрашивании пробирки для анализа образца

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD14-FITC / CD13-PE / CD45-ECD

REF A07722

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Специфичность	CD14	CD13	CD45
Клон	RMO52	SJ1D1	J33
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Isolated human monocytes	KG-1 cell line	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 6,5 – 10	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD14, CD13 и CD45 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 (1,2,3). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (в случае острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (в случае острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1).

Одновременный анализ экспрессии антигенов CD14 и CD13 полезен в дифференциальной диагностике ОМЛ моноцитарного происхождения (фенотип CD14+CD13+) и ОМЛ немоноцитарного происхождения (фенотип CD14–CD13+) (1,2,3,4).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
– Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	96,1	5,5	5,7

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	10	90,3	8,3	9,2
CD13+	10	92,9	6,8	7,4
CD45+	10	90,3	8,3	9,2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	10	99,8	0,1	0,1
CD13+	10	99,6	0,4	0,4
CD45+	10	99,8	0,1	0,1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD14 представляет собой белок с молекулярным весом 53–55 кДа, закрепленный на мембране с помощью гликозилфосфатидилнозитольной группы (GPI) (5).

Антиген CD14 в высокой степени экспрессируется на моноцитах и макрофагах и умеренно – на полиморфноядерных нейтрофилах периферической крови; он также присутствует на плевральных фагоцитах и дендритных ретикулярных клетках. CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарного ряда и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Он отсутствует на Т-лимфоцитах, NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (6,7).

На шестой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (6th HLDA Workshop), проходившей в Кобе, Япония, в 1996 г., было подтверждено, что моноклональные антитела RM052 направлены против CD14 (WS Code: MA62, Section M).

Антиген CD13 экспрессируется на ранних стадиях на поверхности клеток гранулоцитарно-моноцитарного ряда (моноцитах, нейтрофилах, эозинофилах и базофилах) и их коммитированных клеток-предшественников (промежуточных клеток-предшественников, образующих смешанные колонии клеток гранулоцитарно-моноцитарного ряда или КОЕ-ГМ) (8,9,10,11). Молекула CD13 экспрессируется также на клетках негемопоэтических тканей, таких как эпителиальные клетки проксимальных канальцев почек, слизистая тонкого кишечника, клетки эндотелия, фибробласты, стромальные клетки костного мозга, остеокласты и базальные клетки желчных протоков (12).

Моноклональные антитела SJ1D1 взаимодействуют с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами периферической крови. На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела SJ1D1 направлены против CD13 (WS Code: 285, Section M) (9).

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 ().

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 (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре в одном образце определялось процентное содержание положительных клеток, экспрессирующих эти три маркера (IMMUNO-TROL Control Cells каталожный номер 6607077). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Моноциты IMMUNO-TROL	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	12	71,6	1,2	1,7
CD13+	12	99,8	0,1	0,1
CD45+	12	99,8	0,1	0,1

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки линии THP1 (CD14+CD13+CD45+) и клетки линии FRN14.33 (CD14–CD13–CD45–). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение THP1 / FRN14.33 в смеси изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD14	Y = 0,98 X + 0,99	0,999
CD13	Y = 0,97 X + 1,38	0,999
CD45	Y = 1,00 X - 0,03	0,999

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(17).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (18,19).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD41	CD235a	CD45
Клон	P2	11E4B-7-6 (KC16)	J33
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human platelets	Human blood cells	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 5,0 – 7,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD41-FITC / CD235a-PE / CD45-ECD

REF A07723

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флу о рохромом, предназначена для выполнения много параметрического анализа методом проточной цитометрии. Он позволяет проанализировать экс прессию антигенов CD41, гликофорин А (CD235a) и CD45 на клетках гемопоэтического происхож дения.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ экспрессии антигенов CD41 и гликофорина А (глико А) (CD235a) на поверхности бластных кле ток позволяет дифференцировать острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) мегакариоцитарного про исхождения от ОМЛ эритроцитарного происхожде ния (1).

Для выделения целевой популяции бластных кле ток используется гистограмма боковое свето рас сеивание — CD45 (2,3,4). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (случаи ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экс прессия наблюдается на поверхности бластных клеток лимфоидного ряда (случаи острого лимфо бластного лейкоза, ОЛЛ) (2).

ОМЛ мегакариоцитарного происхождения типа М7 имеют фенотип CD41+, глико А+ и CD45слаб., а эритролейкозы (ОМЛ типа М6) — CD41-, глико А+ и CD45слаб (1,5,6,7).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих
Поскольку в популяции нормальных лейкоцитов наблюдалось положительное окрашивание по CD41 и гликофорину A (CD235a), соответствующие референсные интервалы не определены.

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	95,5	4,0	4,2

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	90,2	10,3	11,4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	99,8	0,11	0,1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD41 экспрессируется тромбоцитами, мегакариоцитами и субпопуляцией клеток CD34+ (8).

На пятой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (5th HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1993 г., было подтверждено, что моноклональные антитела P2 направлены против CD41 (WS Code: P086 и BP335, Section M и BP соответственно) (9).

Гликофорин A (CD235a) — основной белок, экс прессируемый эритроцитами и предшествен ни ка ми эритроцитов, включая проэритробласты и ретикулоциты (10,11,12).

Моноклональные антитела 11E4B-7-6 (KC16) вза и модействуют с терминальной 27-39 аминокислотной последо вательностью N-концевого участка гликофорина A и не распознают гликофорин B (11).

На седьмой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (7th HLDA), проходившей в Хэррогите, Англия, в 2000 г., было подтверждено, что данные моноклональные антитела направлены против CD235a (WS Code : 70359, Section : Red Cells) (4).

Молекула CD45 экспрессируется на поверхности лейкоцитов человека, но не экспрессируется на зрелых эритроцитах (14). Плотность экспрессии на лимфоцитах больше, чем на моноцитах или нейтрофилах (15).

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (16).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре опреде ля лось процентное содержание положительно окра шенных клеток целевой популяции, экпрессирую щих эти три маркера (клеточная линия HEL). Из ме рение выполнялось 12 раз. Полученные резуль та ты представлены в следующей таблице:

Линия HEL	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD41+	12	100	0,03	0,03
CD235a+	12	96,2	0,36	0,40
CD45+	12	100	0,00	0,00

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD41	Y=0,97 X + 1,36	0,998
CD235a	Y=0,96 X + 1,13	0,998
CD45	Y=1,00 X – 0,91	0,998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 10^9 лейкоцитов в 1 л.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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(18).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (19,20).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	HLA-DR	CD7	CD45
Клон	Immu357	8H8.1	J33
Гибридома	X63 x Balb/c	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Cell line transformed by EBV	Human thymocytes	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG2a	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 5,0 – 7,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Anti-HLA-DR-FITC / CD7-PE / CD45-ECD

REF A07724

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флу о рохромом, предназначена для выполнения много параметрического анализа методом проточной цитометрии. Он позволяет проанализировать экс прессию антигенов HLA-DR,CD7 и CD45 на клетках гемопоэтического происхож дения.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD45. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 (1,2,3). Небольшая или средняя степень экспрессии антигена CD45 характерна для бластных клеток миелоидного ряда (в случае острого миелобластного лейкоза, ОМЛ), тогда как отсутствие экспрессии или слабая экспрессия будет скорее наблюдаться в бластных клетках лимфоидного ряда (в случае острого лимфобластного лейкоза, ОЛЛ) (1,2,4).

Анализ экспрессии антигенов CD7 и HLA-DR позволяет охарактеризовать бластные клетки миелоидного происхождения, которые имеют фенотип HLA-DR+ $CD7^-$ CD45weak (3). Тем не менее, при гипергранулярном промиелоцитарном лейкозе (вариант ОМЛ-М3) отмечается слабая экспрессия HLA-DR или отсутствие экспрессии этого маркера (3). Аберрантная экспрессия маркера CD7, более характерного для зрелых Т-клеток, может наблюдаться во многих случаях незрелых форм острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) (3).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Чтобы подтвердить или исключить миелоидное происхождение проанализированных бластных клеток, можно провести дополнительные исследования с использованием следующих реагентов IOTest 3:

CD34-FITC / CD33-PE / CD45-ECD (каталожный номер A07717), CD34-FITC / CD117-PE / CD45-ECD (каталожный номер A07718) и HLA-DR-FITC / CD13-PE / CD45-ECD (каталожный номер A07720).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:

    Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD45-ECD (Ref. A07729) или

    Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с негативным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07729 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	50	19,07	8,80	46
CD7+	50	82,88	5,63	7
CD45+	50	95,97	2,38	2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR+	50	87,71	10,08	11
CD45+	50	95,43	2,61	3

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	50	99,89	0,19	0

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

У человека главный комплекс гистосовместимости (MHC) называют системой антигенов лейкоцитов человека (HLA). Молекулы HLA II класса кодируются пятью обласьями в D-локусе (DM, DO, DP, DQ и DR) и обозначаются как антигены HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (5,6).

Антигены HLA II класса экспрессируются только на антиген-презентирующих клетках, т. е. B-лимфоцитах, моноцитах/макрофагах, дендритных клетках и эпидермальных клетках Лангерганса (6,7). Антиген HLA-DR экспрессируется на T-лимфоцитах только после активации (8). На поверхности стволовых клеток и гемопоэтических клеток-предшественников эти антигены экспрессируются до определенных стадий их дифференцировки (6,9).

Моноклональные антитела Immu357 распознают эпитоп мономорфного белка HLA-DR с молекулярным весом 29-33 кДа.

Антиген CD7 представляет собой трансмембранный мономерный гликопротеин с молекулярным весом 40 кДа. Дистальная внеклеточная часть белка состоит из одного домена, подобного «вариабельному региону иммуноглобулина». Экспрессия молекулы CD7 появляется на ранних стадиях онтогенеза T-клеток (внетимусная стадия протимоцита) и продолжается вплоть до стадии зрелого T-лимфоцита (10,11,12). Антиген CD7 присутствует на тимоцитах, на большинстве циркулирующих T-лимфоцитов, на NK-клетках, на субпопуляции пре-B-лимфоцитов, на B-лимфоцитах костного мозга плода и на полипотентных гемопоэтических стволовых клетках (10). Зрелые B-лимфоциты, а также клетки эритроцитарного, миелоидного и мегакариоцитарного происхождения не экспрессируют молекулы CD7 (10,13).

На второй Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (2nd HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1984 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 8H8.1 направлены против CD7 (WS Code: 38, Section T) (14).

Семейство гликопротеинов CD45, экспрессируемое на поверхности лейкоцитов человека, не обнаруживается на зрелых эритроцитах (15). Плотность экспрессии антигена CD45 на лимфоцитах больше, чем на моноцитах или нейтрофилах (16).

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J33 направлены против CD45 (WS Code: 818, Section NL) (17).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание положительно окрашенных клеток целевой популяции, экспрессирующих эти три маркера (клеточные линии DAUDI и/или KG-1a человека). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клеточные линии DAUDI и/или KG-1a	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
DAUDI/HLA-DR$^+$	12	46,35	0,90	1,95
KG-1a/CD7$^+$	12	52,35	0,84	1,61
DAUDI + KG-1a / CD45$^+$	12	99,96	0,09	0,09

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
HLA-DR	Y = 0,98 X + 0,55	0,9992
CD7	Y = 0,97 X + 0,33	0,9998
CD45	Y = 0,99 X + 0,44	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(19).
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.
8. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (20,21).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD5	CD7	CD3
Клон	BL1a	8H8.1	UCHT1
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from the human thoracic duct	Human thymocytes	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG2a	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,0 – 6,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD5-FITC / CD7-PE / CD3-ECD

REF A07725

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD5, CD7 и CD3 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD3. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ экспрессии антигена CD3 как пан-Т-клеточного маркера в сочетании с анализом экспрессии антигенов CD5 и/или CD7 полезен в диагностике Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, таких как Т-клеточный хронический лимфолейкоз (Т-ХЛЛ), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ), синдром Сезари/грибовидный микоз, а также Т-клеточные лимфомы и лейкозы у взрослых (1,2,3).

Анализ внутриклеточной экспрессии антигена CD3 (cCD3) позволяет также идентифицировать клетки-предшественники при Т-клеточном лимфобластном лейкозе (CD5+CD7+mCD3$^-$cCD3+) (mCD3 обозначает мембранную экспрессию CD3) и отличить их от Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза и Т-ХЛЛ (CD5+CD7+mCD3+cCD3+) (3). Кроме того, коэкспрессия антигенов CD5, CD7 и CD3 помогает охарактеризовать и идентифицировать случаи Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD3-ECD (Ref. A07731) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с выбранным отрицательным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07731 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5+	50	69,76	8,37	12
CD7+	50	77,56	6,39	8
CD3+	50	69,21	8,85	13

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела BL1a направлены против CD5 (Code WS: 520, Section T) (4,5).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

На второй Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (2nd HLDA Workshop), проходившей в Бостоне, США, в 1984 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 8H8.1 направлены против CD7 (WS Code: 38, Section T) (6).

Моноклональные антитела UCHT1 распознают ε-цепь как на поверхности молекулы CD3 (7), так и на ее внутрицитоплазматическом участке (8,9). На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что моноклональные антитела UCHT1 направлены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Клеточная линия HPBALL	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5+	12	99,88	0,05	0,05
CD7+	12	55,33	0,47	0,85
CD3+	12	99,79	0,05	0,05

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD5	Y = 0,97 X + 2,45	0,999
CD7	Y = 0,99 X + 0,54	0,999
CD3	Y = 0,99 X + 0,99	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(12).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD8	CD4	CD3
Клон	B9.11	13B8.2	UCHT1
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Cytotoxic human T clone HLA A2	Human thymocytes	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 4,5 - 5,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD8-FITC / CD4-PE / CD3-ECD

REF A07726

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD8, CD4 и CD3 на лейкоцитах.

ПРИНЦИП

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD3. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Антиген CD3 экспрессируется на зрелых Т-лимфоцитах и субпопуляции тимоцитов (1).

CD8-FITC / CD4-PE / CD3-ECD
Антиген CD4 обнаруживается на поверхности субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови (2), а также на поверхности большинства тимоцитов, где часто наблюдается его коэкспрессия с антигеном CD8 (3).Он также экспрессируется моноцитами, но с гораздо меньшей антигенной плотностью.

Антиген CD8 экспрессирован на поверхности субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови, а также на поверхности субпопуляций естественных киллеров (NK-клеток) и Т-лимфоцитов, экспрессирующих TCR γδ, однако с меньшей степенью выраженности и в форме гомодимера CD8α (4).

Учитывая экспрессию пан-Т-клеточного маркера CD3 и маркеров CD4 и CD8, данный реактив IOTest 3 может помочь охарактеризовать многочисленные лимфопролиферативные синдромы Т-клеточного происхождения, такие как хронический Т-клеточный лимфолейкоз (Т-ХЛЛ), пролимфоцитарный Т-клеточный лейкоз (Т-ПЛЛ), синдром Сезари / грибовидный микоз и лейкемическая фаза Т-клеточной лимфомы у взрослых (5,6,7). Кроме того, данным

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

реактивом можно пользоваться для дифференциальной диагностики Т-клеточных лейкозов, возникающих вследствие малигнизации больших гранулярных лимфоцитов (CD3+ CD4– CD8+) и NK-клеток (CD3– CD4– CD8sometimes+) (6,7,8).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: VersaLyse (Ref. A09777).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
    Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD3-ECD (Ref. A07731) или
    Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- 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.

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с выбранным отрицательным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07731 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, следуя рекомендациям изготовителя лизирующего реагента.

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+CD8+	50	35,9	9,4	26,2
CD3+CD4+	50	62,2	9,2	14,8
CD3+	50	75,8	9	11,8

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4+	50	94	3,4	3,6

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) B9.11 взаимодействует с α-субъединицей молекулы CD8 (3). Его специфичность в отношении CD8 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 43, раздел T) (9).

Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел T) (10).

Моноклональное антитело (мАт) UCHT1 взаимодействует с ε-цепью комплекса CD3 (10). Его специфичность в отношении CD3 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 3, раздел T) (9).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 (HPBALL). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

HPBALL	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD8+	12	99,9	0,04	0,04
CD4+	12	99,8	0,06	0,06
CD3+	12	99,8	0,05	0,05

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (HPBALL) и клетки отрицательной линии (DAUDI) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD8	Y= 0,963 X + 2,07	0,999
CD4	Y= 0,992 X + 0,1	0,999
CD3	Y= 0,986 X + 0,38	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. В случае лейкоцитоза кровь следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5 x 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(12).
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.
8. Чтобы предотвратить образование дуплетов клеток, известное как «явление беглеца», этап связывания необходимо выполнить одновременно с процедурой окрашивания (13).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD25	CD4	CD3
Клон	B1.49.9	13B8.2	UCHT1
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human alloactivated T lymphocytes (FC2)	Human thymocytes	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 7,5 – 9,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD25-FITC / CD4-PE / CD3-ECD

REF A07727

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флу о рохромом, предназначена для выполнения много параметрического анализа методом проточной цитометрии. Он позволяет проанализировать экс прессию антигенов CD25,CD4 и CD3 на клетках гемопоэтического происхож дения.

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD3. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ антигена CD3, как общего маркера Т-клеток, в сочетании с анализом антигена CD4 и/или CD25 полезен при диагностике Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, таких как хронический Т-клеточный лимфолейкоз (Т-ХЛЛ), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, грибовидный микоз/синдром Сезари, а также лимфома и Т-клеточный лейкоз у взрослых (1,2,3).

Маркер активации CD25 часто экспрессируется при лейкозах/лимфомах, являющихся результатом трансформации лимфоцитов (например, при инфицировании вирусом HTLV-1 при лейкозе / Т-клеточной лимфоме у взрослых) (3).

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD3-ECD (Ref. A07731) или
Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с выбранным отрицательным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07731 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD25+	50	10,88	5,12	47
CD4+	50	42,84	11,96	28
CD3+	50	68,26	8,97	13

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4+	50	92,19	3,81	4

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD25 представляет собой α-субъединицу рецептора интерлейкина 2 (IL-2Rα), трансмембранный гликопротеин массой 55 кДа (4).

Высокоаффинный рецептор IL-2 состоит из трех цепей: α *(IL-2Rα, Tac, p55 или CD25), β (IL-2Rβ, p75 или CD122) и γ *(IL-2Rγ, p64 или CD132).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Антиген CD25 экспрессируется на циркулирующих неактивированных CD4+ Т-лимфоцитах и не экспрессируется на циркулирующих неактивированных CD8+ Т-лимфоцитах (5). Однако при активации все Т-лимфоциты экспрессируют CD25. Антиген CD25 экспрессируется на субпопуляции В-лимфоцитов CD20+. Циркулирующие гранулоциты, моноциты, естественные киллеры, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют молекулу CD25 (4).

На второй Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (2nd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens), проходившей в Бостоне, США, в 1984 г., было подтверждено, что моноклональные антитела B1.49.9 направлены против CD25 (WS Code: T141, Section T) (6).

Молекула CD4 – это мономерный гликопротеин с молекулярной массой 60 кДа. Антиген CD4 присутствует на Т4-клетках, субпопуляции Т-клеток, включающих хелперные/индукторные клетки (7). Молекула CD4 присутствует примерно на 45% лимофцитов периферической крови, 80% тимоцитов и в низкой плотности – на 100% моноцитов и некоторых нейтрофилах (8,9).

На третьей Международной конференции по диффенцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 13B.8.2 направлены против CD4 (Code WS: 501, Section T) (10).

Антиген CD3 – это комплекс, сформированный 5 инвариантными полипептидными цепями (γ, δ, ε, ζ и η), имеющими молекулярную массу от 20 до 25 кДа и образующими один из гетеродимеров, αβ или γδ, которые входят в состав Т-клеточного рецептора (TCR). Антиген CD3 экспрессируется только зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (11). В периферической крови от 67 до 76% лимфоцитов составляют CD3+-клетки. Относительное количество Т-лимфоцитов зависит от возраста, у детей младшего возраста их содержание снижено (8).

Моноклональные антитела UCHT1 распознают цепь ε CD3, как на поверхности клетки (12), так и в цитоплазме (13,14). На первой Международной конференции по диффенцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Фанция, в 1982 г., было подтверждено, что данные моноклональные антитела направдены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре в одном образце определялось процентное содержание положительных клеток целевой популяции, экспрессирующей один из трех маркеров (линии клеток человека FEV20.3 или MOLT16). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

FEV20.3/MOLT16	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
FEV20.3/CD25+	12	44,18	1,16	2,6
FEV20.3/CD4+	12	39,32	1,13	2,9
MOLT16/CD3+	12	56,64	1,12	2,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD25	Y = 0,94 X + 2,65	0,9998
CD4	Y = 0,98 X + 0,44	0,9992
CD3	Y = 0,97 X + 1,10	0,9992

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 10^9 лейкоцитов в 1 л.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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(17).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD16	CD56	CD3
Клон	3G8	N901 (NKH-1)	UCHT1
Гибридома	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Human neutrophils	Human chronic myeloid leukaemia cells (CML)	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 3,5 – 7,5	PE / Protein: 0,5 - 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
CD16-FITC / CD56-PE / CD3-ECD

REF A07728

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она позволяет проанализировать экспрессию антигенов CD16, CD56 и CD3 на лейкоцитах.

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

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest 3. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет помещать клетки в электронное «окно», задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, который окрашивает антиген CD3. На этапе гейтинга используются и другие гистограммы, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром. Популяцию клеток, выделенная методом гейтинга в соответствии с приведенным описанием, затем делят на субпопуляции, для чего используют параметры флуоресценции двух других флуорофоров. Таким способом находят различия между положительно окрашенными клетками и неокрашенными клетками. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ 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 экспрессирован на NK-клетках (3,4) и на субпопуляции CD3+ Т-клеток (5). Он не экспрессируется моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами.

Данный реагент IOTest 3 полезен при дифференциальной диагностике Т-клеточного варианта лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов (CD16+ CD56– CD3+) и NK-клеточного варианта (CD16+ CD56+ CD3–) (6,7,8,9). Чтобы подтвердить Т-клеточное или NK-клеточное происхождение этих лейкозов, фенотипирование можно проводить с использованием реагента IOTest 3 CD8-FITC/CD4-PE/CD3-ECD (каталожный номер A07726). Т-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+.

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  – Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  – Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  – Один из нижеследующих отрицательных контролей IOTest 3:
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/CD3-ECD (Ref. A07731) или
  Neg.Ctrl.-FITC/Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца с выбранным отрицательным контролем IOTest 3 (каталожный номер A07731 или A07732).

1. В каждую тестовую пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку — по 20 мкл отрицательного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16+	50	13,2	7,2	54
CD56+	50	17,7	7,2	41
CD3+	50	72,7	7,1	10

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16+	50	75,4	16,4	22

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16+	50	87,4	12,1	14

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).

Моноклональное антитело (мАт) UCHT1 взаимодействует с ε-цепью комплекса CD3 (12). Его специфичность в отношении CD3 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 3, раздел T) (13).

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	12	71,3	0,5	0,6
CD56+	12	16,3	0,46	2,8

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD56+	12	96,1	0,23	0,2

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной и отрицательной линий 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 были окрашены в соответствии сописанной 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 + 1,37	0,999
CD3	Y= 0,980 X + 1,51	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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 x 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(15).
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	Not applicable	Not applicable	CD45
Клон	679.1Mc7	679.1Mc7	J33
Гибридома	X63 x Balb/c	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Non-biological Hapten	Non-biological Hapten	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 2,5 – 5,0	PE / Protein: 0,5 – 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Neg.Ctrl.-FITC / Neg.Ctrl.-PE / CD45-ECD

REF A07729

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь конъюгированных с флуорохромами антител (Negative Control-FITC/Negative Control-PE/CD45-ECD) из серии IOTest 3 предназначена для многопараметрического анализа лейкоцитов с помощью проточной цитометрии. Реагент позволяет оценить степень неспецифического связывания конъюгированных антител из этой серии с лейкоцитами человека.

ПРИНЦИП

Конъюгаты антител данного реагента откалиброваны для применения в методиках прямого иммунологического окрашивания для проточной цитометрии.

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. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток по двум другим флуоресцентным параметрам (FITC и PE) от всех клеток гейтированной популяции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, возникающих при анализе антигенов методом проточной цитометрии, является наличие в разной степени выраженного неспецифического связывания моноклональных антител в процессе окрашивания. Длятого, чтобы обеспечить специфичность связывания, при измерении сигнала после окрашивания необходимо учесть эффект неспецифического связывания (1,2).

Данная комбинация антител из серии IOTest 3 используется в качестве негативного контроля для тех комбинаций IOTest 3, которые включают CD45-ECD. Реагент служит для оценки степени неспецифического связывания при окрашивании моноклональными антителами из серии IOTest 3, конъюгированными с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином R (PE).

Распределение отрицательных популяций должно быть таким же, как фоновый шум, возникающий вследствие аутофлуоресценции и неспецифического окрашивания каждой целевой популяции. Гистограмма, отражающая светорассеивание в прямом направлении под малыми углами (Forward Scatter или FS) против светорассеивания в боковом направлении (Side Scatter или SS), позволяет отличить лимфоциты от дебриса.

Гистограмма для сбора данных, отображающая Светорассеивание в боковом направлении (SS) против Флуоресценции CD45-ECD, позволяет выделить целевую популяцию, которая затем анализируется на гистограмме FITC против PE.

Аналогичная гистограмма (SS против CD45-ECD) в дальнейшем используется для анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ
Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Комбинация конъюгатов антител из серии реагентов IOTest 3, третьим компонентом которой является CD45-ECD.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании любого образца необходимо также проанализировать контрольный образец. При использовании комбинаций коньюгированных антител из серии IOTest 3, третьим компонентом которых является CD45 ECD, одним их адаптированных негативных контролей является комбинация Neg.Ctrl. FITC / Neg.Ctrl. PE / CD45 ECD (каталожный номер A07729).

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. (каталожный номер A07729).
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	91,9	6,63	7

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	86,6	11,34	13

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	10	99,7	0,30	0,3

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональные антитела 679.1Mc7, относящиеся к подклассу IgG1, не связываются специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов человека.

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

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре с использованием одной и той же целевой популяции положительных клеток (линии KG-1a l) определялось процентное содержание CD45-положительных клеток и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) отрицательных клеток для изотипических контролей. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Клеточная линия KG-1a	Номер	Среднее	Станд. откл. (SD)	CV (%)
MFI (IgG1-FITC)	12	1,78	0,03	1,83
MFI (IgG1-PE)	12	0,72	0,02	2,98
(%) CD45	12	99,9	0,07	0,07

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 x 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(5).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (6,7).
8. В связи с тандемной структурой флуорохрома ECD также излучает свет при 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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	Not applicable	Not applicable	CD19
Клон	679.1Mc7	679.1Mc7	J3-119
Гибридома	X63 x Balb/c	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Non-biological Hapten	Non-biological Hapten	Lymphoma cells SKLY18
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 2,5 – 5,0	PE / Protein: 0,5 – 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Neg.Ctrl.-FITC / Neg.Ctrl.-PE / CD19-ECD

REF A07730

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Эта смесь конъюгированных с флуорохромом антител (отрицательный контроль-FITC / отрицательный контроль-PE / CD19-ECD) представляет собой отрицательный контроль, подходящий для проточной цитометрии с мультипараметрическим анализом в качестве вспомогательного метода селекции. Она позволяет продемонстрировать неспецифическое окрашивание всего IOTest 3, использующего CD19-ECD.

ПРИНЦИП

Принцип использования негативного контроля предполагает, что окрашивание образца неспецифическими моноклональными антителами отражает степень неспецифического связывания специфических антител с лейкоцитами в образце.

При исследовании любого образца параллельно с инкубацией образца со специфическим реагентом из серии IOTest 3 необходимо также провести окрашивание образца данным негативным контролем. Затем выполняется лизис эритроцитов в обеих пробирках. 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 CD19. Для гейтирования популяций также можно использовать другие двухпараметровые гистограммы.

Сравнение уровней флуоресценции целевой популяции при связывании с отрицательным контролем с уровнями флуоресценции целевой популяции при окрашивании специфическими антителами серии IOTest 3 позволяет отличить окрашенные клетки от неокрашенных (1,2).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - – одна из смесей коньюгатов специфических антител из серии IOTest 3, в которой CD19-ECD используется для гейтирования.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца помимо контрольной пробирки необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца со специфическими конъюгированными антителами серии IOTest 3.

1. В каждую из пробирок для анализа контроля добавьте по 20 мкл отрицательного контроля, а в каждую из пробирок для анализа клинических образцов — по 20 мкл специального раствора конъюгированных антител IOTest 3.
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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19+	50	10,8	5,7	53

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., было подтверждено, что моноклональные антитела J3-119 направлены против CD19 (3,4).

Моноклональные антитела 679.1Mc7 имеют такие же структурные характеристики, как и все специфические моноклональные антитела из серии IOTest 3, однако они не имеют специфичности в отношении любых клеточных антигенов (2).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание окрашенных клеток положительной линии (RAMOS). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице в виде процентного содержания окрашенных клеток для CD19 и в виде показателя средней интенсивности флуоресценции (MFI) для неспецифических антител, конъюгированных с FITC и PE.

Клетки линии RAMOS	Номер	Среднее	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19+ (%)	12	99,9	0,05	0,05
FITC (MFI)	12	0,84	0,01	1,8
PE (MFI)	12	0,12	0,05	1,27

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Линейность

Для проверки линейности окрашивания CD19 данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии (RAMOS) и клетки отрицательной линии (HPBALL). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19	Y = 0,996 X + 0,166	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 x 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(6).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	Not applicable	Not applicable	CD3
Клон	679.1Mc7	679.1Mc7	UCHT1
Гибридома	X63 x Balb/c	X63 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Non-biological Hapten	Non-biological Hapten	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 2,5 – 5,0	PE / Protein: 0,5 – 1,5	ECD / Protein: 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		

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Neg.Ctrl.-FITC / Neg.Ctrl.-PE / CD3-ECD

REF A07731

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Эта смесь конъюгированных с флуорохромом антител (отрицательный контроль-FITC / отрицательный контроль-PE / CD3-ECD) представляет собой отрицательный контроль, подходящий для проточной цитометрии с мультипараметрическим анализом в качестве вспомогательного метода селекции. Она позволяет продемонстрировать неспецифическое окрашивание всего IOTest 3, использующего CD3-ECD.

ПРИНЦИП

Принцип использования негативного контроля предполагает, что окрашивание образца неспецифическими моноклональными антителами отражает степень неспецифического связывания специфических антител с лейкоцитами в образце.

При исследовании любого образца параллельно с инкубацией образца со специфическим реагентом из серии IOTest 3 необходимо также провести окрашивание образца данным негативным контролем. Затем выполняется лизис эритроцитов в обеих пробирках. 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. Для гейтирования популяций также можно использовать другие двухпараметровые гистограммы.

Сравнение уровней флуоресценции целевой популяции при связывании с отрицательным контролем с уровнями флуоресценции целевой популяции при окрашивании специфическими антителами серии IOTest 3 позволяет отличить окрашенные клетки от неокрашенных (1,2).

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- 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: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Один из специальных растворов конъюгированных антител из линейки IOTest 3, где используется CD3-ECD при гейтировании.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

При исследовании каждого образца помимо контрольной пробирки необходимо проанализировать дополнительную пробирку, содержащую смесь образца со специфическими конъюгированными антителами серии IOTest 3.

1. В каждую из пробирок для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest, а в каждую из пробирок для анализа контролей — по 20 мкл негативного 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. 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторите шаг 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Средние значения результатов, полученных для популяций лимфоцитов этих

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	50	72,9	9,1	13

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что моноклональные антитела UCHT1 направлены против CD3 (3).

Моноклональные антитела 679.1Mc7 имеют такие же структурные характеристики, как и все специфические моноклональные антитела из серии IOTest 3, однако они не имеют специфичности в отношении любых клеточных антигенов (2).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре определялось процентное содержание окрашенных клеток положительной линии (HPBALL). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице в виде процентного содержания окрашенных клеток для CD3 и в виде показателя средней интенсивности флуоресценции (MFI) для неспецифических конъюгированных с FITC и PE антител.

HPBALL	Номер	Среднее	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+ (%)	12	99,9	0,05	0,05
FITC (MFI)	12	1,09	0,03	3
PE (MFI)	12	0,11	0,001	0,7

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Линейность

Для проверки линейности окрашивания CD3 данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии (HPBALL) и клетки отрицательной линии (RAMOS). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3	Y = 0,997 X - 0,14	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 x 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(5).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

IOTest 3
Conjugated Antibodies
Neg.Ctrl.-FITC / Neg.Ctrl.-PE / Neg.Ctrl.-ECD

REF A07732

25 определений; 0.5 мл
20 мкл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Специфичность	Not applicable	Not applicable	Not applicable
Клон	679.1Mc7	679.1Mc7	679.1Mc7
Гибридома	X63 x Balb/c	X63 x Balb/c	X63 x Balb/c
Иммуноген	Non-biological Hapten	Non-biological Hapten	Non-biological Hapten
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	FITC / Protein: 2,5 – 5,0	PE / Protein: 0,5 – 1,5	ECD / Protein: 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		

Эта смесь конъюгированных антител (отрицательный контроль-FITC / отрицательный контроль-PE / отрицательный контроль-ECD) из диапазона IOTest 3 подходит для проточной цитометрии с мультипараметрическим анализом. Она позволяет определять неспецифическое окрашивание смесей конъюгированных антител, принадлежащих к этому диапазону, на лейкоцитах человека.

ПРИНЦИП

Конъюгаты антител данного реагента откалиброваны для применения в методиках прямого иммунологического окрашивания для проточной цитометрии.

Проточный цитометр анализирует флуоресценцию клеток, помещенных в электронное окно, задаваемое на гистограмме, которая соотносит рассеивание света анализируемыми клетками под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с флуоресценцией ECD, или на любых других гистограммах, которые могут сопоставлять другие параметры, измеряемые цитометром. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данная комбинация антител группы IOTest 3 может использоваться в качестве отрицательного контроля со всеми реактивами группы IOTest 3. Действительно, эта комбинация служит для определения неспецифического окрашивания смесями антител, конъюгированных с флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ), R-фикоэритрином (ФЭ) и ФЭ-TxR (ECD), которые входят в эту группу.

Распределение отрицательных популяций должно быть похоже на фоновый шум, обусловленный аутофлуоресценцией или неспецифическим окрашиванием, в каждой анализируемой популяции. Гистограмма рассеивания света под малым углом (прямое рассеивание - Forward Scatter или FS) против рассеивания света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) позволяет исключить наличие в популяции разрушенных клеток, а также отличить лимфоциты от моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов. Окно накопления сигнала, которым ограничивается целевая популяция, используется для создания второй, третьей и четвертой гистограмм, соотносящих между собой другие параметры флуоресценции (ФИТЦ прротив ФЭ, ФЭ против ECD и ФИТЦ против ECD).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

То же самое окно накопления сигнала дублируется для анализа с использованием специфической смеси конъюгированных антител группы IOTest 3, выбранных для исследования.

РЕАГЕНТЫ

Обратитесь в сервисный центр компании Beckman Coulter, чтобы получить концентрацию антитела в IOTest3 реагент.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Лизирующий реактив: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
  - Фиксирующий реактив: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
  - Сочетание конъюгатов специфических антител из группы реактивов IOTest 3.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Для каждого образца помимо тест-пробирки используется соответствующая контрольная пробирка. Комбинация контролей Neg.Ctrl.-FITC / Neg.Ctrl.-PE/Neg.Ctrl.-ECD (Ref. A07732) адаптирована для использования с любыми используемыми комбинациями конъюгированных антител группы IOTest 3.

1. В каждую тест-пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest 3, а в каждую контрольную пробирку – по 20 мкл соответствующего отрицательного контроля. (Ref. A07732).
2. В обе пробирки добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин 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. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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 до 24 часов;

   – в 0,5 мл или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

   Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) на клетках человеческой линии HPBALL для неспецифически связанных конъюгатов антител с FITC, PE и ECD. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Клеточная линия HPBALL	Номер	Средняя величина (СИФ)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
FITC (MFI)	12	2,56	0,04	1,6
PE (MFI)	12	1,16	0,02	2,2
ECD (MFI)	12	1,00	0,02	2,2

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования 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 x 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(4).
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.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2
Специфичность	CD3	CD4
Клон	UCHT1	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 6,0	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	

IOTest
Conjugated Antibodies
CD3-FITC
CD4-PE

REF A07733

50 тестов; 1 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD3 и CD4. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Обнаружение и подсчет CD4+ лимфоцитов при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие иммунодефицитные состояния, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после трансплантации костного мозга и/или трансплантации органов. Фенотипирование и мониторинг CD4+ популяций при злокачественных новообразованиях крови, таких как лейкозы и лимфомы (3).

РЕАГЕНТЫ

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль: реагент FITC / PE:

  IOTest reagent. (каталожный номер A07794).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07794.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	50	66,51	9,90	14,89
CD4+	50	55,91	10,82	19,35

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) UCHT1 взаимодействует с ε-цепью комплекса CD3 (4).

Специфичность мАт UCHT1 в отношении CD3 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 3, раздел T) (5).

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (6). МАт 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (7).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3 +	12	59,40	0,69	1,2
Лимфоциты CD4 +	12	42,56	0,84	2,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (HPBALL) и клетки отрицательной линии (DAUDI) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3	Y = 0,97 X + 1,11	0,999
CD4	Y = 0,99 X - 0,23	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

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

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2
Специфичность	CD3	CD8
Клон	UCHT1	B9.11
Гибридома	NS1 x Balb/c	
Иммуноген	T cell line + IL2	Cytotoxic HLA A2 T clone
Иммуноглобулин	IgG1	
Вид	Мышь	
Очистка	Аффинная хроматография	
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 6,0	FITC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm	
Пик эмиссии	525 nm	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3	

IOTest
Conjugated Antibodies
CD3-FITC
CD8-PE

REF A07734

50 тестов; 1 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD3 и CD8. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет субпопуляции CD8+ Т-лимфоцитов при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (1), аутоиммунные заболевания, реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга. (2) Определение характеристик и подсчет NK-клеток. При злокачественных дискразиях крови, таких как лейкоз и лимфома, последующее наблюдение и фенотипирование субпопуляций Т-лимфоцитов (3).

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль: реагент FITC / PE:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

IOTest reagent. (каталожный номер A07794).

- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07794.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 пробы цельной крови 50 здоровых взрослых были обработаны с использованием реагента IOTest 3 CD8-FITC/CD4-PE/CD3-ECD (REF. A07726). Результаты, полученные для количества положительных интересующих явлений с этим реагентом, приводятся в таблицах ниже:

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	50	75,8	9	11,8
CD3+ CD8+	50	35,9	9,4	26,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) UCHT1 взаимодействует с ε-цепью комплекса CD3 (4).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Специфичность мАт UCHT1 в отношении CD3 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 3, раздел T) (5).

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (6).

На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что моноклональные антитела B9.11 направлены против CD8 (WS Code: 43, Section T) (7).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3 +	12	84,67	0,46	0,5
Лимфоциты CD8 +	12	28,90	0,68	2,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (HPBALL) и клетки отрицательной линии (DAUDI) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3	Y = 0,98 X + 0,49	0,999
CD8	Y = 1,00 X - 0,70	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

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

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2	Спецификации компонента 3
Специфичность	CD3	CD16	CD56
Клон	UCHT1	3G8	N901 (NKH-1)
Гибридома	NS1 x Balb/c	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2	Human neutrophils	Human chronic myeloid leukaemia cells (CML)
Иммуноглобулин	IgG1		
Вид	Мышь		
Очистка	Аффинная хроматография		
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	
концентрация	FITC / Protein: 3,5 - 6,0	PE / Protein: 0,5 - 1,5	
λ возбуждения	488 nm		
Пик эмиссии	525 nm	575 nm	
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3		

IOTest
Conjugated Antibodies
CD3-FITC
CD(16+56)-PE

REF A07735

50 тестов; 1 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD3 и CD16. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ НК-клеток (CD3– / CD16+ / CD56+) (1,2) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+ / CD16+ / CD56+) (3).

РЕАГЕНТЫ

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль: реагент FITC / PE:

  IOTest reagent. (каталожный номер A07794).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07794.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	50	66,98	6,9	10
CD16+/56+	50	8,86	4,28	48
CD3–/ CD16+/CD56+	50	8,39	3,86	46

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) UCHT1 взаимодействует с ε-цепью комплекса CD3 (4).

Специфичность мАт UCHT1 в отношении CD3 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 3, раздел T) (5).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Специфичность мАт 3G8 в отношении CD16 была установлена IV Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Вене, Австрия, в 1989 г. (код WS: 409, раздел NL) (6).

Специфичность мАт N901 (NKH-1) в отношении CD56 была установлена IV Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Вене, Австрия, в 1989 г. (код WS: 9, раздел NL) (7).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	12	70,66	0,62	0,9
CD16+/56+	12	24,44	0,74	3,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (HUT78 для CD3, GRANU для CD16 и MO7E для CD56) и клетки отрицательной линии (эритроциты для CD3 и CD56; FRN 17.4.14.33 для CD16) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3-FITC	Y = 0,97 X + 1,20	0,998
CD16-PE	Y = 0,98 X + 0,32	0,999
CD56-PE	Y = 0,97 X + 0,67	0,998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

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

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2
Специфичность	CD3	CD19
Клон	UCHT1	J3-119
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2	SKLY18 lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 6,0	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	

IOTest
Conjugated Antibodies
CD3-FITC
CD19-PE

REF A07736

50 тестов; 1 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD3 и CD19. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ соотношений между Т- и В-лимфоцитами. Антиген CD3 экспрессирован только на Т-клетках, к которым относятся зрелые Т-лимфоциты и субпопуляция тимоцитов. В периферической крови примерно 75% лимфоцитов имеют фенотип CD3+. Это процентное отношение ниже у детей раннего возраста и изменяется в зависимости от возраста (1). Антиген CD19 экспрессирован на всех В-клетках за исключением плазмоцитов (2,3).

Этот ранний маркер В-клеток экспрессируется на поверхности бластов до начала внутрицитоплазматического синтеза IgM (4,5,66). В периферической крови от 10 до 15% лимфоцитов имеют фенотип CD19+. У детей раннего возраста, особенно в первые месяцы жизни, это процентное отношение гораздо выше, чем у взрослых. В течение первого года жизни данная особенность быстро становится все менее выраженной и в возрасте около 10 лет величина достигает уровней, которые наблюдаются у взрослых.

РЕАГЕНТЫ

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Этот тест можно так же легко проводить по цельной крови, как по клеткам, сепарированным по градиенту плотности.

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль: реагент FITC / PE:
  IOTest reagent. (каталожный номер A07794).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07794.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	50	72,9	9,1	13
CD19+	50	10,8	5,7	53

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело (мАт) UCHT1 взаимодействует с ε-цепью комплекса CD3 (7).

Специфичность мАт UCHT1 в отношении CD3 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 3, раздел T) (8).

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 (2,3).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 (лимфоциты). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3 +	12	74,8	0,6	0,8
Лимфоциты CD19 +	12	11,8	0,3	2,2

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии HPBALL (CD3+CD19–) и клетки отрицательной линии RAMOS (CD3–CD19+) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3	Y = 0,97 X + 1,93	0,999
CD19	Y = 0,99 X + 0,17	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

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

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2
Специфичность	CD3	HLA-DR
Клон	UCHT1	Immu-357
Гибридома	NS1 x Balb/c	X63 x Balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2	EBV-transformed cell line
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 6,0	PE / Ig : 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	

IOTest
Conjugated Antibodies
CD3-FITC
Anti-HLA-DR-PE

REF A07737

50 тестов; 1 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD3 и HLA-DR. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ процента активированных Т-лимфоцитов в периферической крови. Антиген CD3 экспрессируется только на поверх-ности клеток Т-линии, к которым относятся зрелые Т-лимфоциты и субпопуляция тимоцитов. В пе¬ри-ферической крови примерно 75% лимфоцитов со-ставляют клетки фенотипа CD3+. У детей этот по-казатель ниже, с возрастом он меняется (1). Антиген HLA-DR, в основном, экспрессируется на поверхности различных типов клеток периферi-ческой крови, в особенности на поверхности анти-ген-представляющих клеток. Напротив, уровень его экспрессии на поверхности Т-клеток разнится и отражает активацию Т-клеток (1).

РЕАГЕНТЫ

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Изотипический контроль: реагент FITC / PE:

  IOTest reagent. (каталожный номер A07794).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07794.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 52 образцов крови здоровых взрослых людей.

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+	52	73,0	11,2	15
CD3+HLA-DR+	52	21,0	13,1	62

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) UCHT1 взаимодействует с ε-цепью комплекса CD3 (2).

Специфичность мАт UCHT1 в отношении CD3 была установлена I Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Париже, Франция, в 1982 г. (код WS: 3, раздел T) (3).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Моноклональные антитела Immu357 распознают эпитоп на мономорфном белке с массой 29-33 кДа, обозначаемом как HLA-DR.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3 +	12	69,9	0,8	1,1
Lymphocytes CD3+HLA-DR+	12	9,2	0,5	5,6

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии HPBALL ($CD3^+$ $HLA\text{-}DR^-$) и клетки отрицательной линии DAUDI ($CD3^-HLA\text{-}DR^+$). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток по-ложительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3	Y = 0,98 X + 1,19	0,999
HLA-DR	Y = 0,98 X + 0,87	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (4).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (5).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

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

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2
Специфичность	CD45	CD14
Клон	Immu19.2	RMO52
Гибридома	X63 x balb/c	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	FU7.57 cell line transformed by EBV	Isolated human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1	IgG2a
Вид	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
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	

IOTest
Conjugated Antibodies
CD45-FITC
CD14-PE

REF A07738

50 тестов; 1 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данные конъюгированные с флуорохромом антитела предназначены для идентификации и подсчета популяций клеток, экспрессирующих антигены CD45 и CD14. Анализ выполняется в биологических образцах человека методом 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
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

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

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

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 образцов крови здоровых взрослых людей.

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45+	50	95,4	3,2	3

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

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45 +	50	98,5	2,2	2
CD14 +	50	98,5	2,2	2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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, NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (3,4).

На шестой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (6th HLDA Workshop), проходившей в Кобе, Япония, в 1996 г., было подтверждено, что моноклональные антитела RMO52 направлены против CD14 (WS Code: MA62, Section M) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45 +	12	97,9	0,36	0,4
Моноциты CD14 +	12	97,7	0,38	0,4

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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45	Y = 1,00 X + 0,50	0,999
CD14	Y = 1,00 X - 0,31	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (8,9).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

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

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификация компонента 1	Спецификация компонента 2
Специфичность	HLA-B27	HLA-B7
Клон	HLA-ABC-m3	BB7.1
Гибридома	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Частично очищенный антиген HLA-B27, экстрагированный из линии Bordin (HLA-B27+)	Частично очищенный антиген B7 HLA-A2, полученный папаиновым гидролизом
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)
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% NaN3	

Anti-HLA-B27-FITC
Anti-HLA-B7-PE

REF A07739

НАЗНАЧЕНИЕ

Эта смесь флуорохрома и конъюгированного антитела позволяет выполнить идентификацию и подсчет клеточных популяций, экспрессирующих антиген HLA-B27, присутствующий в биологических пробах человека, с использованием проточной цитометрии.

Роль моноклонального антитела, специфически распознающего HLA-B7, состоит в выявлении этого антигена, являющегося основной причиной перекрестной реакции клона антител, распознающих антиген HLA-B27 (1,2).

Не применять для определения тканевой группы антигенов HLA-B.

ПРИНЦИП

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

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 светорассеяние и флуоресценцию клеток.

Это дает возможность разграничения интересующей популяции в электронном окне, определенном на гистограмме, что коррелирует с ортогональным светорассеянием (боковое рассеяние, или SS) и рассеянием света под острым углом (прямое рассеяние, или FS).

Другие гистограммы, сочетающие два из других параметров, доступных на цитометре, могут использоваться как вспомогательные на стадии селекции, в зависимости от приложения, выбранного пользователем.

Флуоресценцию разграниченных клеток анализируют с целью различения положительно-окрашенных и неокрашенных событий. В этом тесте, в отличие от преобладающего большинства других цитометрических тестов, фенотипирование HLA-B27 подтверждается путем сравнения интенсивности флуоресценции испытуемой пробы с интенсивностью флуоресценции сертифицированных проб HLA-B27+ и HLA-B27–.

МЕТОДОЛОГИЯ

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы:

  Флуоросферы Flow-Set (номер по каталогу Beckman Coulter 6607007)
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль: Смесь мышиных IgG2a-ФИТЦ и IgG1-ФЭ.
- Реактив для компенсационной коррекции: Смесь моноклональных антител CD8-ФИТЦ и CD4-ФЭ.
- Контрольный образец крови: IMMUNO-TROL Control Cells (Ref. 6607077).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Антигены HLA-B27 и HLA-B7 принадлежат к группе перекрестной реакции B7 (CREG HLA-B7).

Среди других антигенов HLA-B, принадлежащих к CREG HLA-B7, можно указать B42 и B22 (с подразделением на B54, B55 и B56), B40 (с подразделением на B60 и B61), а также B41, B47 и B13 (3).

Моноклональное антитело HLA-ABC-m3 распознает антиген HLA-B27. Он пересекается с антигеном HLA-B7 (4) и также может стать фиксированным, но менее ограниченным образом, к другим антигенам CREG HLA-B7.

Моноклональное антитело BB7.1 распознает антиген HLA-B7 (5, 6).

Она, хотя является высокоспецифичной, пересекается с антигеном HLA-B42 (2). Антигены HLA-B27, для которых было обнаружено 15 аллелей (B*2701-15) (7), и HLA-B7, для которых было обнаружено 11 аллелей (B*0702-12) (7), экспрессируют у 7% и 22% лиц европеоидного происхождения (8, 9).

Эта смесь позволяет дать характеристики специфичности HLA-B27 в аллотипе HLA I класса у пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, влияющими на крестцово-подвздошные и дугоотростчатые суставы.

Это обнаружение способствует диагностике анкилозирующего спондилита. 90% страдающих этим заболеванием экспрессирует антиген HLA-B27, по сравнению с 7% в нормальной популяции (10, 11, 12, 13).

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Следует с осторожностью обращаться с растворами антител, содержащими натрия азид (NaN_3).

   Не принимайте внутрь и избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ, СТАБИЛЬНОСТЬ И УТИЛИЗАЦИЯ

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

Стабильность реагента в нераспечатанном флаконе: см. срок годности, указанный на этикетке флакона.

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

ПОДГОТОВКА

Пробирки для образцов крови с известным HLA фенотипом

Для каждого из этих 4 образцов готовят тест-пробирку и контрольную пробирку, а затем выполняют процедуры окрашивания, описанные далее в данном разделе: МЕТОДИКА / ПРОЦЕДУРА

Пробирка для компенсационных настроек

Готовят пробирку для компенсационных настроек, проводя окраску образца крови здорового донора или контрольного образца крови Immuno-Trol (Ref. 6607077) смесью CD8-FITC/CD4-PE (следуют процедуре, описанной в разделе МЕТОДИКА / ПРОЦЕДУРА, но, во-первых, исключают пробирку для изотипического контроля, и, во-вторых, используют объем реактива, рекомендованный изготовителем смеси для 100 мкл крови).

КОРРЕКЦИЯ ФОТОУМНОЖИТЕЛЯ

Анализируют пробирку с контролем крови HLA-B27– B7– и корректируют сигналы FITC и PE (с логарифмическим усилением) таким образом, чтобы интенсивность флуоресценции на двухпараметрической гистограмме FITC относительно PE по лимфоцитам находилась в счетчике первой декады, как показано на гистограмме на рисунке 1.

Анализируют тестовую пробирку с кровью HLA-B27– B7– и проверяют сравнимость полученной гистограммы с гистограммой на рисунке 2.

Скорректируйте квадранты таким образом, чтобы 98% популяции лимфоцитов находилось в квадранте 3.

КОМПЕНСАЦИОННЫЕ НАСТРОЙКИ

Анализируют пробирку, окрашенную смесью CD8-FITC/CD4-PE, и настраивают компенсацию флуоресценции таким образом, чтобы на гистограмме FITC versus PE средние величины интенсивностей флуоресценции были идентичными по оси Y в квадрантах 3 и 4, а также идентичными по оси X в квадрантах 1 и 3.

КОНТРОЛЬ ПОРОГОВЫХ ЗНАЧЕНИЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Данное контрольное исследование проводят с использованием образца крови, типированной по HLA.

Образец HLA-B27+ B7–

Анализируют пробирку с образцом контрольной крови фенотипа HLA-B27– B7+. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 1.

Анализируют пробирку с образцом исследуемой крови фенотипа HLA-B27+ B7–. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 3, где все лимфоциты обнаруживаются в квадранте 4.

Образец HLA-B27–B7+

Анализируют пробирку с образцом контрольной крови фенотипа HLA-B27– B7+. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 1.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Анализируют пробирку с образцом исследуемой крови фенотипа HLA-B27– B7+. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 4.

Популяция лимфоцитов распределена между квадрантами 1 и 2. Эта ситуация вполне нормальна, и не следует пытаться ее скомпенсировать. Полученная картина обусловлена тем, что моноклональное антитело HLA-ABC-m3 перекрестно реагирует с фенотипом HLA-B7. Часть эпитопов HLA-B7 занята антителом HLA-ABC-m3. Также возможна ситуация, когда популяция лимфоцитов будет полностью находиться в квадранте 1. Такая карина соответствует отсутствию перекрестной реакции моноклональных антител HLA-ABC-m3 с эпитопами HLA-B7.

Образец HLA-B27+B7+

Анализируют пробирку с образцом контрольной крови фенотипа HLA-B27+ B7+. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 1.

Анализируют пробирку с образцом исследуемой крови фенотипа HLA-B27+ B7+. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 5.

Проба HLA-B27-B7-

Анализируют пробирку с образцом контрольной крови фенотипа HLA-B27– B7–. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 1.

Анализируют пробирку с образцом исследуемой крови фенотипа HLA-B27– B7–. Полученная гистограмма должна быть сравнима с приведенной на Рисунке 2.

ПРОБЫ

Этот тест можно так же легко проводить по цельной крови, как по клеткам, сепарированным по градиенту плотности.

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

Пробы следует хранить при комнатной температуре (18–25°C), не встряхивая.

Пробу следует гомогенизировать, осторожно перемешав, до отбора тестовой пробы.

Образцы подлежат анализу в течение 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

При первом использовании реактива настройку цитометра можно проводить только по крови, для которой полностью документирован HLA фенотип. Получают образцы крови следующих фенотипов:

- Цельная кровь с фенотипом HLA-B27+ B7–.
- Цельная кровь с фенотипом HLA-B27+ B7+.
- Цельная кровь с фенотипом HLA-B27– B7+.
- Цельная кровь с фенотипом HLA-B27– B7–.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА

ПРИМЕЧАНИЕ. Клинические ответы, полученные при этом тесте, зависят от интенсивности флуоресценции; они в большой степени зависят от корректировок компенсации, очень важно с каждой серией анализов использовать пробирку для подтверждения этих корректировок.

Для проверки см. раздел **ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЕ КОРРЕКТИРОВКИ**.

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 специфических конъюгированных антител IOTest, а в каждую контрольную пробирку – необходимое количество 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. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, следуя рекомендациям изготовителя лизирующего реагента.

   Для примера, если требуется использовать лизирующий раствор IOTest 3 Lysis Solution (REF. A07799), добавляют 2 мл этого реагента в рабочей концентрации (1X).

   Немедленно перемешивают на вортексе и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре, защищая от света.

   Если образец не содержит эритроцитов, вместо лизирующего раствора добавляют 2 мл ФСБ.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   – 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;

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЕ НАСТРОЙКИ

Данная процедура цитометрической настройки должна полностью проводиться только при первом использовании реактива. С другой стороны, компенсационныые настройки, описанные в данном разделе, необходимо производить повторно перед каждой серией анализов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все популяции лимфоцитов, расположенные в квадранте 3, можно рассматривать как имеющие фенотип HLA-B27– (и HLA-B7–).

Все популяции лимфоцитов, расположенные в квадранте 1, можно рассматривать как имеющие фенотип HLA-B27– (и HLA-B7+).

Все популяции лимфоцитов, расположенные в квадранте 4, можно рассматривать как имеющие фенотип HLA-B27+– при условии, что квадранты устанавливали не по изотипическому контролю, а по образцу с фенотипом HLA-B27– B7–.

Все популяции лимфоцитов, распределенные между квадрантами 3 и 4, с высокой вероятностью имеют фенотип HLA-B27+ (и HLA-B7–).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Однако необходимо поставить подтверждающий тест (микротест на лимфоцитотоксичность или тест на основе ПЦР).

Все популяции лимфоцитов, распределенные между квадрантами 1 и 2, с высокой вероятностью имеют фенотип HLA-B27– (и HLA-B7+).

Однако необходимо поставить подтверждающий тест (микротест на лимфоцитотоксичность или тест на основе ПЦР).

Все популяции лимфоцитов, сосредоточенные в квадранте 2, с высокой вероятностью имеют фенотип HLA-B27+ (и HLA-B7+).

Однако необходимо поставить подтверждающий тест (микротест на лимфоцитотоксичность или тест на основе ПЦР).

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Специфичность моноклонального антитела HLA-ABC-m3 по отношению к антигену HLA-B27 исследована Trapani, J.A. et al. (4), а моноклонального антитела BB7.1 – Brodsky, F.M. et al. (5).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Тест линейности окрашивания не имеет биологической значимости, так как у конкретного лица либо 100% клеток являются HLA-B27+, либо 100% клеток являются HLA-B27–.

С другой стороны, такой реагент должен демонстрировать у HLA-B27–B7– доноров среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для лимфоцитов, как в отношении специфичности HLA-B27, так и в отношении специфичности HLA-B7, значительно меньшую наблюдаемой у доноров HLA-B27+ B7+.

Это отражается отношениями MFI+/ MFI–, рассчитанными по среднему значению 12 определений MFI от донора HLA-B27+ B7+ (MFI+) и от донора HLA-B27– B7– (MFI–), как показано в следующей таблице.

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (СИФ)	CV (%)	Отношение СИФ+/СИФ–
HLA-B27+	12	29,6	2,2	114
HLA-B27–	12	0,26	2,4	
HLA-B7+	12	33,9	1,7	168
HLA-B7–	12	0,20	1,7	

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Неприменимо

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку определение субъекта в группу специфичности HLA B27 основано на измерении интенсивности флуоресценции каждого анализируемого лимфоцита, а не на проценте окрашенных лимфоцитов, исследование внутрилабораторной сходимости основано на MFI этой популяции.

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений СИФ лимфоцитов в крови донора с фенотипом HLA-B27+ B7+. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (СИФ)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-B27	12	29,6	0,65	2,2
HLA-B7	12	33,9	0,56	1,7

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Этот реактив не подлежит разведению, разделению на аликвоты и замораживанию. Не используйте реактив после истечения срока годности, указанного на флаконе.
3. Фикоэритрин (ФЭ) чувствителен к свету, поэтому все инкубации следует проводить в темноте.
4. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
5. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
6. Конъюгированные антитела в составе реактива откалиброваны 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.
7. При гиперлейкоцитозе образец следует развести PBS до концентрации примерно 5 x 109 лейкоцитов/л (14).
8. При таких заболеваниях, как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатия, лизис эритроцитов может идти медленно и быть неполным или даже невозможным.

   В таком случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки, используя градиент плотности (например, фиколл), перед окрашиванием (15).
9. Выявление у больного фенотипа HLA-B27 не означает, что данный больной страдает анкилозирующим спондилитом. Напротив, только 90% лиц, страдающих данным заболеванием, имеют фенотип HLA-B27+.

ВОЗМОЖНЫЕ ПОМЕХИ (ПЕРЕКРЕСТНЫЕ РЕАКЦИИ)

1. Моноклональное антитело HLA-ABC-m3, распознающее антиген HLA-B27, перекрестно реагирует с антигеном HLA-B7 (4) и в меньшей степени с антигенами CREG HLA-B7.
2. С другой стороны, моноклональное антитело BB7.1, распознающее антиген HLA-B7, перекрестно реагирует с антигеном HLA-B42 (2 – 5).
3. Выявление при помощи данного реактива двойного положительного фенотипа (HLA-B27+ HLA-B7+) может быть результатом экспресси следующих типов:

- гетерозиготной экспрессии генотипа HLA-B27 / HLA-B7,
- гетерозиготной экспрессии генотипа HLA-B7 / HLA-BY,
- гомозиготной экспрессии генотипа HLA-B7 / HLA-B7.

Поэтому следует поставить подтверждающий тест (микротест на лимфоцитотоксичность или тест на основе ПЦР).

РАЗНОЕ

Ссылки (References) смотрите в Приложении (Appendix).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип, Flow-Set, IMMUNO-TROL, IOTest являются товарными знаками Beckman Coulter, Inc. и зарегистрированы в USPTO (Бюро по регистрации патентов и товарных знаков США).

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD1a
Клон	BL6
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD1a-PE

REF A07742 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD1a, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Изучение пролиферации гистиоцитов и дендритных клеток (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD1a-PE^{-}	10	99,86	0,19	0,19

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD1a-PE^{-}	10	99,61	0,42	0,42

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD1a-PE^{-}	10	99,81	0,24	0,24

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Первоначально было установлено, что моноклональные антитела клона BL6 обладают специфичностью к тимоцитам (2).

На третьей Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (3rd HLDA Workshop), проходившей в Оксфорде, Англия, в 1986 г., было подтверждено, что моноклональные антитела BL6 направлены против CD1a (Code WS: 427) (3,4).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD1a -PE+	12	35,94	0,64	1,8

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MOLT4)) и клетки отрицательной линии ((RAMOS)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD1a-PE	Y=0,99 X+1,22	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^{9} лейкоцитов/л (5).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (6).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD2
Клон	39C1.5
Гибридома	X63 x rat
Иммуноген	PHA-stimulated human lymphoblasts
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Крыса
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,0-7,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD2-FITC

REF A07743 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD2, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD2 присутствует на приблизительно 80% лимфоцитов периферической крови у здорового человека, на 95% тимоцитов и на 100% Т-клеточных лимфоцитов (1). Континуум слабой экспрессии антигена CD2 был описан для моноцитов, наиболее положительные из которых демонстрируют характеристики дифференцировки дендритных клеток (2). CD2 экспрессирует на большинстве Т-клеток и NK-клеток человека и играет важную роль в передаче сигнала и в опосредовании клеточной адгезии в Т-лимфоцитах и NK-клетках (3). Преобладающее преимущество Т-клеточных лимфом и лейкозов также экспрессирует CD2, благодаря чему возможно использовать присутствие антигена для отличения этих состояний от В-клеточных новообразований.

В то время как CD2 не является строго специфичным для линии Т-клеток маркером, он полезен при идентификации Т-клеточной лимфобластной лимфоме (T-LBL). T-LBL представляет примерно 2% всех лимфом и обычно TdT-положительная и по-разному экспрессирует CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 и CD8 (4). Подобным образом, CD2 также является полезным маркером для идентификации клеток острого Т-клеточного лейкоза-лимфомы (ATLL), которые обычно экспрессируют цитоплазменные CD3, CD2/CD5/CD30/CD25 и CD1a, но отрицательны на TdT и мембранные CD3/CD7/CD4/CD8/CD34/CD10 (5). Изредка CD2 ошибочно экспрессирует на опухолевых клетках миелоидной линии. Уникальная экспрессия CD2 на миелоидных клонах может быть полезной для определения минимального остаточного заболевания (6, 7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A12689.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A12689.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD2-FITC+	50	82,1	6,7	8

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD2 рассматривается как член суперсемейства иммуноглобулинов; у него есть два иммуноглобилинподобных домена во внеклеточной части (8, 9). Экспрессия CD2 и молекулярное взаимодействие связано с человеческим опосредованным Т-лимфоцитами цитолизом (10). Молекула клеточной адгезии CD2 и ее лиганд CD58 предлагают хорошие примеры взаимодействия белок-белок в клетке, принимающего участия в иммунном ответе. Кроме того, внутриклеточные сигнальные пути и сети CD2 открываются путем идентификации нескольких белков, связывающих цитозольный хвост (11). Недавно было продемонстрировано, что взаимодействие рецептор-лиганд CD2-CD58/48 способствует образованию нанотрубок и требуется для него в человеческих NK-клетка, содействуя цитотоксической функции NK-клеток (12). Моноклональное антитело 39C1.5 ингибирует розеткообразование с бараньими эритроцитами (13).

Он был отнесен к CD2 во время семинара 2nd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: 144, секция T) (14, 15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD2-FITC +	12	83,7	0,62	0,7

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((JURKAT)) и клетки отрицательной линии ((RAMOS)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD2-FITC	Y = 0,97 X + 1,17	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD2
Клон	39C1.5
Гибридома	X63 x rat
Иммуноген	PHA-stimulated human lymphoblasts
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Крыса
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD2-PE

REF A07744 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD2, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD2 присутствует на приблизительно 80% лимфоцитов периферической крови у здорового человека, на 95% тимоцитов и на 100% Т-клеточных лимфоцитов (1). Континуум слабой экспрессии антигена CD2 был описан для моноцитов, наиболее положительные из которых демонстрируют характеристики дифференцировки дендритных клеток (2). CD2 экспрессирует на большинстве Т-клеток и NK-клеток человека и играет важную роль в передаче сигнала и в опосредовании клеточной адгезии в Т-лимфоцитах и NK-клетках (3). Преобладающее преимущество Т-клеточных лимфом и лейкозов также экспрессирует CD2, благодаря чему возможно использовать присутствие антигена для отличения этих состояний от В-клеточных новообразований.

В то время как CD2 не является строго специфичным для линии Т-клеток маркером, он полезен при идентификации Т-клеточной лимфобластной лимфоме (T-LBL). T-LBL представляет примерно 2% всех лимфом и обычно TdT-положительная и по-разному экспрессирует CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 и CD8 (4). Подобным образом, CD2 также является полезным маркером для идентификации клеток острого Т-клеточного лейкоза-лимфомы (ATLL), которые обычно экспрессируют цитоплазменные CD3, CD2/CD5/CD30/CD25 и CD1a, но отрицательны на TdT и мембранные CD3/CD7/CD4/CD8/CD34/CD10 (5). Изредка CD2 ошибочно экспрессирует на опухолевых клетках миелоидной линии. Уникальная экспрессия CD2 на миелоидных клонах может быть полезной для определения минимального остаточного заболевания (6, 7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A09142.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09142.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD2+	50	82,1	6,7	8

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD2 рассмотривается как член суперсемейства иммуноглобулинов; у него есть два иммуноглобилинподобных домена во внеклеточной части (8, 9). Экспрессия CD2 и молекулярное взаимодействие связано с человеческим опосредованным Т-лимфоцитами цитолизом (10). Молекула клеточной адгезии CD2 и ее лиганд CD58 предлагают хорошие примеры взаимодействия белок-белок в клетке, принимающего участия в иммунном ответе. Кроме того, внутриклеточные сигнальные пути и сети CD2 открываются путем идентификации нескольких белков, связывающих цитозольный хвост (11). Недавно было продемонстрировано, что взаимодействие рецептор-лиганд CD2-CD58/48 способствует образованию нанотрубок и требуется для него в человеческих NK-клетка, содействуя цитотоксической функции NK-клеток (12). Моноклональное антитело 39C1.5 ингибирует розеткообразование с бараньими эритроцитами (13).

Он был отнесен к CD2 во время семинара 2nd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: 144, секция T) (14, 15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD2 +	12	70,1	1,02	1,4

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((JURKAT)) и клетки отрицательной линии ((RAMOS)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD2	Y = 0,98 X + 0,53	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD2
Клон	39C1.5
Гибридома	X63 x rat
Иммуноген	PHA-stimulated human lymphoblasts
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Крыса
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD2-PC5

REF A07745 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD2, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD2 присутствует на приблизительно 80% лимфоцитов периферической крови у здорового человека, на 95% тимоцитов и на 100% Т-клеточных лимфоцитов (1). Континуум слабой экспрессии антигена CD2 был описан для моноцитов, наиболее положительные из которых демонстрируют характеристики дифференцировки дендритных клеток (2). CD2 экспрессирует на большинстве Т-клеток и NK-клеток человека и играет важную роль в передаче сигнала и в опосредовании клеточной адгезии в Т-лимфоцитах и NK-клетках (3). Преобладающее преимущество Т-клеточных лимфом и лейкозов также экспрессирует CD2, благодаря чему возможно использовать присутствие антигена для отличения этих состояний от В-клеточных новообразований.

В то время как CD2 не является строго специфичным для линии Т-клеток маркером, он полезен при идентификации Т-клеточной лимфобластной лимфоме (T-LBL). T-LBL представляет примерно 2% всех лимфом и обычно TdT-положительная и по-разному экспрессирует CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 и CD8 (4). Подобным образом, CD2 также является полезным маркером для идентификации клеток острого Т-клеточного лейкоза-лимфомы (ATLL), которые обычно экспрессируют цитоплазменные CD3, CD2/CD5/CD30/CD25 и CD1a, но отрицательны на TdT и мембранные CD3/CD7/CD4/CD8/CD34/CD10 (5). Изредка CD2 ошибочно экспрессирует на опухолевых клетках миелоидной линии. Уникальная экспрессия CD2 на миелоидных клонах может быть полезной для определения минимального остаточного заболевания (6, 7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A09148.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09148.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD2+	50	82,0	6,6	8

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD2 рассмотривается как член суперсемейства иммуноглобулинов; у него есть два иммуноглобилинподобных домена во внеклеточной части (8, 9). Экспрессия CD2 и молекулярное взаимодействие связано с человеческим опосредованным Т-лимфоцитами цитолизом (10). Молекула клеточной адгезии CD2 и ее лиганд CD58 предлагают хорошие примеры взаимодействия белок-белок в клетке, принимающего участия в иммунном ответе. Кроме того, внутриклеточные сигнальные пути и сети CD2 открываются путем идентификации нескольких белков, связывающих цитозольный хвост (11). Недавно было продемонстрировано, что взаимодействие рецептор-лиганд CD2-CD58/48 способствует образованию нанотрубок и требуется для него в человеческих NK-клетка, содействуя цитотоксической функции NK-клеток (12). Моноклональное антитело 39C1.5 ингибирует розеткообразование с бараньими эритроцитами (13).

Он был отнесен к CD2 во время семинара 2nd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: 144, секция T) (14, 15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 11 измерений процентного содержания окрашенных клеток в целевой популяции. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD2 +	11	80,5	1,7	2,1

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((JURKAT)) и клетки отрицательной линии ((K562)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD2	Y = 0,85 X + 4,38	0,98

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 6,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-FITC

REF A07746 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD3, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3-FITC+	50	72,9	9,1	12,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3-FITC +	12	65,7	1,03	1,6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((RAMOS)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3-FITC	Y= 0,991 X + 1,29	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-PE

REF A07747 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD3, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3-PE+	50	72,9	9,1	12,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3-PE +	12	68,5	0,6	0,9

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((RAMOS)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3-PE	Y = 0,998 X + 0,26	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-ECD

REF A07748 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD3, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07797.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3-ECD+	50	72,9	9,1	12,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3-ECD +	12	81,9	0,97	1,2

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((RAMOS)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3-ECD	Y = 0,998 X + 0,93	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-PC5

REF A07749 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD3, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3-PC5+	50	74,2	8,8	11,8

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3-PC5 +	12	84,2	7,0	8,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HUT 78)) и клетки отрицательной линии ((FRN3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3-PC5	Y = 0,97 X + 0,14	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4,0-7,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD4-FITC

REF A07750 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD4, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Этот реагент обеспечивает описание клеточных популяций лимфоцитов CD4+ при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие состояния иммунодефицита, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа. Последующее наблюдение и фенотипирование клеточных популяций CD4+ (3) при злокачественных дискразиях крови, таких как лейкемии и лимфомы.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-FITC+	50	55,91	10,82	19,35

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-FITC+	50	90,86	4,97	5,47

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (4). МАт 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD4-FITC +	12	35,76	11,17	3,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD4-FITC	Y = 0,98 X + 1,46	0,9999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD4-PE

REF A07751 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD4, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Этот реагент обеспечивает описание клеточных популяций лимфоцитов CD4+ при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие состояния иммунодефицита, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа. Последующее наблюдение и фенотипирование клеточных популяций CD4+ (3) при злокачественных дискразиях крови, таких как лейкемии и лимфомы.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-PE+	50	55,91	10,82	19,4

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-PE+	50	90,86	4,97	5,47

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (4). МАт 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD4-PE +	12	37,84	0,80	2,1

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD4-PE	Y = 1 X - 0,38	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD4-PC5

REF A07752 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD4, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Этот реагент обеспечивает описание клеточных популяций лимфоцитов CD4+ при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие состояния иммунодефицита, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа. Последующее наблюдение и фенотипирование клеточных популяций CD4+ (3) при злокачественных дискразиях крови, таких как лейкемии и лимфомы.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 49 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-PC5+	49	46,82	8,75	18,69

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (4). МАт 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 11 измерений процентного содержания окрашенных клеток в целевой популяции. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD4-PC5 +	11	44,56	1,97	4,42

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD4-PC5	Y = 0,99 X + 0,19	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD5
Клон	BL1a
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from human thoracic duct
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD5-PE

REF A07753 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD5, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD5 является многофункциональным рецептором, экспрессируемым в сочетании с антиген-специфическими рецепторами на лимфоциты T и B-1a. CD5 играет роль регулятора некроза клеток и рецептора подавления патоген-ассоциированных молекулярных паттернов.

CD5 является T-клеточный маркером, экспрессируемым в развившихся злокачественных B-клеточных новообразованиях и других B-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваниях. Экспрессия CD5 удобна для определения скрытых моноклональных T-клеточных лимфоцитозов и диагностирования T-клеточных новообразований без лейкоцитоза и без признаков неоплазии по клеточной морфологии. В континууме у нормальных политипичных B-клеток экспрессия CD5 постоянна преимущественно на более поздних этапах созревания и в развившихся B-клетках. Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 обеспечивает более точное различие между такими различными B-клеточными пролиферациями, как B-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, мелкоклеточные лимфомы (CD5+ CD23+CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5+CD23– CD19+) (1,2,3,4,5,6).

CD5 используется в дифференциальной диагностике целого ряда лимфом с экспрессией периферической крови (проявление лейкозов), например, a) CD5-положительной фолликулярной лимфомы, b) анализа на остаточную минимальную болезнь неходжкиновских лимфом B-клеточного пути (CD5+), c) CD5-положительной фолликулярной лимфомы; d) CD5-положительной (CD5+) диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL) e) лимфомы из клеток маргинальной зоны (SP-MZL). CD5 рассматривается как независимый ненадежный прогностический признак крайне агрессивной диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (7,8).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD10 позволяет определить характеристики различных случаев B-клеточной неоплазии (6), например, B-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозов, мелкоклеточные лимфом (CD5+CD10– CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5– CD10+ CD19+) (1,2). Этот анализ также позволяет отличить острые лимфобластные B-клеточные лейкемии (B-ALL) и острые лимфобластные пре-B-клеточные лейкемии (CD5– CD10+CD19+) от пролимфоцитарных лейкозов (CD5– CD10– CD19+) (3,9,10,11,12).

Хронический лимфолейкоз (CLL) характеризуется клональной экспансией B-клеток (CD5(+)CD23(+)) в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных тканях. Анализ уровня экспрессии генов и фенотипические исследования показывают, что хронический лимфолейкоз (CLL), возможно, развивается из B-клеток CD5(+), аналогичных тем, которые обнаружен в крови здоровых взрослых индивидов (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A09142.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A09142.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5-PE+	50	73	7,7	10,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов большинством тимоцитов и подгруппой популяции В-лимфоцитов (13,14,15). CD5 экспрессируется в подгруппе В-клеток, выделяющих IgM, из-за недостаточного объема терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) фермента, который появляется для подавления активации BSR, и, тем самым, снижает аутоиммунную реакцию. С другой стороны, Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD5, чем В-клетки. CD5 положительно регулируется в Т-клетках при сильной активации. В вилочковой железе имеется корреляция с экспрессией CD5 и интенсивностью взаимодействия Т-клеток по отношению к аутопептидам. Экспрессия CD5 не обнаружена в гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (15). Во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (Код WS: 520, раздел T) для CD5 было назначено моноклональное антитело BL1a (13,14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD5-PE +	12	73	2,7	3,7

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MOLT4)) и клетки отрицательной линии ((RPMI18866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD5-PE	Y = 1,00X - 0,09	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD5
Клон	BL1a
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from human thoracic duct
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD5-PC5

REF A07754 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD5, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD5 является многофункциональным рецептором, экспрессируемым в сочетании с антиген-специфическими рецепторами на лимфоциты T и B-1a. CD5 играет роль регулятора некроза клеток и рецептора подавления патоген-ассоциированных молекулярных паттернов.

CD5 является T-клеточный маркером, экспрессируемым в развившихся злокачественных B-клеточных новообразованиях и других B-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваниях. Экспрессия CD5 удобна для определения скрытых моноклональных T-клеточных лимфоцитозов и диагностирования T-клеточных новообразований без лейкоцитоза и без признаков неоплазии по клеточной морфологии. В континууме у нормальных политипичных B-клеток экспрессия CD5 постоянна преимущественно на более поздних этапах созревания и в развившихся B-клетках. Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 обеспечивает более точное различие между такими различными B-клеточными пролиферациями, как B-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, мелкоклеточные лимфомы (CD5+ CD23+CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5+CD23– CD19+) (1,2,3,4,5,6).

CD5 используется в дифференциальной диагностике целого ряда лимфом с экспрессией периферической крови (проявление лейкозов), например, a) CD5-положительной фолликулярной лимфомы, b) анализа на остаточную минимальную болезнь неходжкиновских лимфом B-клеточного пути (CD5+), c) CD5-положительной фолликулярной лимфомы; d) CD5-положительной (CD5+) диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL) e) лимфомы из клеток маргинальной зоны (SP-MZL). CD5 рассматривается как независимый ненадежный прогностический признак крайне агрессивной диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (7,8).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD10 позволяет определить характеристики различных случаев B-клеточной неоплазии (6), например, B-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозов, мелкоклеточные лимфом (CD5+CD10– CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5– CD10+ CD19+) (1,2). Этот анализ также позволяет отличить острые лимфобластные B-клеточные лейкемии (B-ALL) и острые лимфобластные пре-B-клеточные лейкемии (CD5– CD10+CD19+) от пролимфоцитарных лейкозов (CD5– CD10– CD19+) (3,9,10,11,12).

Хронический лимфолейкоз (CLL) характеризуется клональной экспансией B-клеток (CD5(+)CD23(+)) в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных тканях. Анализ уровня экспрессии генов и фенотипические исследования показывают, что хронический лимфолейкоз (CLL), возможно, развивается из B-клеток CD5(+), аналогичных тем, которые обнаружен в крови здоровых взрослых индивидов (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A09148.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A09148.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5-PC5+	50	73	7,7	10,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов большинством тимоцитов и подгруппой популяции В-лимфоцитов (13,14,15). CD5 экспрессируется в подгруппе В-клеток, выделяющих IgM, из-за недостаточного объема терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) фермента, который появляется для подавления активации BSR, и, тем самым, снижает аутоиммунную реакцию. С другой стороны, Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD5, чем В-клетки. CD5 положительно регулируется в Т-клетках при сильной активации. В вилочковой железе имеется корреляция с экспрессией CD5 и интенсивностью взаимодействия Т-клеток по отношению к аутопептидам. Экспрессия CD5 не обнаружена в гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (15). Во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (Код WS: 520, раздел Т) для CD5 было назначено моноклональное антитело BL1a (13,14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD5-PC5 +	12	75	1,2	1,6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MOLT4)) и клетки отрицательной линии ((RPMI18866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD5-PC5	Y= 1,00 X - 0,32	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD7
Клон	8H8.1
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,0 - 7,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD7-FITC

REF A07755 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD7, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии антигена CD7 в качестве индикатора Т-линии в сочетании с экспрессией антигенов CD3 и CD5 полезен для диагностики пролиферативных синдромов Т-клеток, например, острых лимфобластных лейкозов (T-ALL) и пролимфоцитарных лейкозов Т-клеток (1,2,3,4). Их использование параллельно с другими миелоидными маркерами (миелопероксидаза и CD33), а также маркерами В-линии (CD79 и CD19) позволяет идентифицировать более 98% острых лейкозов (1). Антиген CD7 может экспрессироваться определенными острыми незрелыми миелоидными лейкозами (AML) (1). Использование методов измерения было предложено для классификации острых бифенотипических лейкозов (5). В этом контексте антиген CD7 считается скорее индикатором недифференцированной природы новообразования, а не маркером Т-линии (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A12689.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A12689.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD7-FITC+	50	78	6,5	8,25

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD7 является мономерным трансмембранным гликопротеином с молекулярным весом 40 кДа. Дистальная внеклеточная часть этого белка включает уникальный участок типа «вариабельной области иммуноглобулина».

Молекула CD7 экспрессируется рано в онтогенезе Т-клеток (внетимусная протимоцитная стадия) и сохраняется до стадии зрелых Т-клеток лимфоцитов (6,7,8). Антиген CD7 присутствует в тимоцитах, на большинстве циркулирующих Т-клеток лимфоцитов, на NK-клетках, на подгруппе популяции пре-В лимфоцитов, на В-клетках лимфоцитов, происходящих из эмбрионального костного мозга, а также на кроветворных плюрипотентных стволовых клетках (9,10). С другой стороны, зрелые В-клетки лимфоцитов и клетки эритроцитарного, миелоидного и мегакариоцитарного происхождения не экспрессируются CD7 (6,10). Моноклональное антитело 8H8.1 было отнесено к CD7 во время 2-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1984 году (код WS: 38, секция T) (11).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD7-FITC +	12	82	0,5	0,5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((CEM)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD7-FITC	Y = 0,99 X + 0,02	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human cytotoxic T-lymphocyte clone (HLA A2)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4,5 - 5,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD8-FITC

REF A07756 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD8, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Т-клетки CD8+ традиционно классифицируются как Т-лимфоциты Т-клеток/цитотоксические Т-клетки. Анализ популяции лимфоцитов CD8+ с помощью проточной цитометрии является очень эффективным компонентом при определении ранее не исследованных различных функциональных поднаборов памяти, цитотоксических препаратов и функциональных поднаборов эффекторов. Таким образом, оценка CD8 является очень полезной для оценки компетентности Т-клеток и изменяется под воздействием множества факторов иммунодефицита, аутоиммунных состояний и неоплазии, в частности лейкемии, вызываемой Т-клетками, и лимфом.

Кратковременное распространение популяции Т-клеток CD8+ Т обычно происходит на раннем этапе заражения ВИЧ. Считается, что эти популяции роста клеток CD8+ способны содействовать нецитотоксичному подавлению репликации ВИЧ. Постоянное распространение этой популяции наблюдается при двух связанных условиях: синдром диффузного инфильтративного лимфоцитоза (СДИЛ) и связанный с ВИЧ синдром лимфоцитоза CD8+ (1,2). CD8 является маркером Т-клеток, который часто проявляется вместе с CD4 и распознается в большинстве Т-клеточных злокачественных опухолях, например при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и анапластической крупноклеточной лимфоме (3).

Т-клеточный лейкоз взрослых достаточно часто присутствуют в организме не проходящих лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающим фенотипом CD4+. С другой стороны наблюдалось резкое увеличение самопроизвольного распространения опухоли, что преобладает с лимфоцитами CD8+ у пациентов NHIH. Таким образом, размножение клона HTLV-1 положительных лимфоцитов CD8+ и CD4+ происходит с использованием двух разных механизмов. Поэтому инфекция HTLV-1 устанавливает предлейкозный фенотип, который ограничен инфицированными CD4+ клонами (4).

Т-клетки CD8+ Т участвуют в инициации, распространении и регулировании нескольких патогенных аутоиммунных реакций. Аутореактивные Т-клетки CD8+ также могут обеспечивать аутоиммунитет, секретируя цитокины, способные повышать восприимчивость целевых клеток к цитотоксичности, или секретируя хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в область аутоиммунитета. Кроме того, было выявлено, что аутореактивные Т-клетки CD8+ уменьшают аутоиммунные реакции. Т-клетки CD8+ участвуют в патогенезе не менее чем 30 аутоиммунных нозологических единиц в основном за счет цитотоксического воздействия на различные целевые клетки (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 здоровых взрослых доноров с использованием реагента IOTest 3 CD8-FITC/CD4-PE/CD3-ECD (каталожный номер A07726). Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD8 +	50	35,9	9,4	26,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD8 является димером с дисульфидной связью, который существует либо в виде гомодимера CD8α, либо в виде гетеродимера CD8αβ. CD8β необходим для поверхностной экспрессии CD8α. Молекулярный вес каждого мономера α и β составляет примерно 32–34 kDa (6, 7). CD8 связывается с неполиморфным доменом (α3-доменом) молекул MHC класса I (8). Молекула CD8 присутствует в поднаборе Т-клеток лимфоцитов периферийной крови человека. Поднабор NK-клеток экспрессирует антиген CD8, но с малой и средней плотностью экспрессии (9).

Гомодимер CD8α экспрессируется NK-клетками и Т-клетками γδ+. CD8 также присутствует в большинстве тимоцитов, где он часто коэкспрессирует с CD4, а также в субпопуляции костномозговых клеток. Молекула CD8 взаимодействует с рецептором Т-клетки (TCR) в качестве корецептора для антигенраспознающей клетки, ограниченной MHC класса I (10, 11). CD8 широко используется как маркер цитотоксических Т-лимфоцитов.

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (12).

B9.11 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD8 на первом International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека), который проводился в Paris, Франция, в 1982 г. (13, 14)

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD8-FITC +	12	29	1,1	3,7

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD8-FITC	Y = 0,973 X +0,78	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).
7. Чтобы предотвратить образование дуплетов клеток, известное как «явление беглеца» (escapee phenomenon), этап связывания необходимо выполнить одновременно с процедурой окрашивания (17).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human cytotoxic T-lymphocyte clone (HLA A2)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD8-PE

REF A07757 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD8, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Т-клетки CD8+ традиционно классифицируются как Т-лимфоциты Т-клеток/цитотоксические Т-клетки. Анализ популяции лимфоцитов CD8+ с помощью проточной цитометрии является очень эффективным компонентом при определении ранее не исследованных различных функциональных поднаборов памяти, цитотоксических препаратов и функциональных поднаборов эффекторов. Таким образом, оценка CD8 является очень полезной для оценки компетентности Т-клеток и изменяется под воздействием множества факторов иммунодефицита, аутоиммунных состояний и неоплазии, в частности лейкемии, вызываемой Т-клетками, и лимфом.

Кратковременное распространение популяции Т-клеток CD8+ Т обычно происходит на раннем этапе заражения ВИЧ. Считается, что эти популяции роста клеток CD8+ способны содействовать нецитотоксичному подавлению репликации ВИЧ. Постоянное распространение этой популяции наблюдается при двух связанных условиях: синдром диффузного инфильтративного лимфоцитоза (СДИЛ) и связанный с ВИЧ синдром лимфоцитоза CD8+ (1,2). CD8 является маркером Т-клеток, который часто проявляется вместе с CD4 и распознается в большинстве Т-клеточных злокачественных опухолях, например при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и анапластической крупноклеточной лимфоме (3).

Т-клеточный лейкоз взрослых достаточно часто присутствуют в организме не проходящих лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающим фенотипом CD4+. С другой стороны наблюдалось резкое увеличение самопроизвольного распространения опухоли, что преобладает с лимфоцитами CD8+ у пациентов NHIH. Таким образом, размножение клона HTLV-1 положительных лимфоцитов CD8+ и CD4+ происходит с использованием двух разных механизмов. Поэтому инфекция HTLV-1 устанавливает предлейкозный фенотип, который ограничен инфицированными CD4+ клонами (4).

Т-клетки CD8+ Т участвуют в инициации, распространении и регулировании нескольких патогенных аутоиммунных реакций. Аутореактивные Т-клетки CD8+ также могут обеспечивать аутоиммунитет, секретируя цитокины, способные повышать восприимчивость целевых клеток к цитотоксичности, или секретируя хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в область аутоиммунитета. Кроме того, было выявлено, что аутореактивные Т-клетки CD8+ уменьшают аутоиммунные реакции. Т-клетки CD8+ участвуют в патогенезе не менее чем 30 аутоиммунных нозологических единиц в основном за счет цитотоксического воздействия на различные целевые клетки (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 50 здоровых взрослых доноров с использованием реагента IOTest 3 CD8-FITC/CD4-PE/CD3-ECD (каталожный номер A07726). Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD8 +	50	35,9	9,4	26,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD8 является димером с дисульфидной связью, который существует либо в виде гомодимера CD8α, либо в виде гетеродимера CD8αβ. CD8β необходим для поверхностной экспрессии CD8α. Молекулярный вес каждого мономера α и β составляет примерно 32–34 kDa (6, 7). CD8 связывается с неполиморфным доменом (α3-доменом) молекул MHC класса I (8). Молекула CD8 присутствует в поднаборе Т-клеток лимфоцитов периферийной крови человека. Поднабор NK-клеток экспрессирует антиген CD8, но с малой и средней плотностью экспрессии (9).

Гомодимер CD8α экспрессируется NK-клетками и Т-клетками γδ+. CD8 также присутствует в большинстве тимоцитов, где он часто коэкспрессирует с CD4, а также в субпопуляции костномозговых клеток. Молекула CD8 взаимодействует с рецептором Т-клетки (TCR) в качестве корецептора для антигенраспознающей клетки, ограниченной MHC класса I (10, 11). CD8 широко используется как маркер цитотоксических Т-лимфоцитов.

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (12).

B9.11 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD8 на первом International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека), который проводился в Paris, Франция, в 1982 г. (13, 14)

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD8-PE +	12	30,2	0,4	1,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD8-PE	Y = 0,991 X - 0,224	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human cytotoxic T-lymphocytes clone (HLA A2)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD8-PC5

REF A07758 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD8, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Т-клетки CD8+ традиционно классифицируются как Т-лимфоциты Т-клеток/цитотоксические Т-клетки. Анализ популяции лимфоцитов CD8+ с помощью проточной цитометрии является очень эффективным компонентом при определении ранее не исследованных различных функциональных поднаборов памяти, цитотоксических препаратов и функциональных поднаборов эффекторов. Таким образом, оценка CD8 является очень полезной для оценки компетентности Т-клеток и изменяется под воздействием множества факторов иммунодефицита, аутоиммунных состояний и неоплазии, в частности лейкемии, вызываемой Т-клетками, и лимфом.

Кратковременное распространение популяции Т-клеток CD8+ Т обычно происходит на раннем этапе заражения ВИЧ. Считается, что эти популяции роста клеток CD8+ способны содействовать нецитотоксичному подавлению репликации ВИЧ. Постоянное распространение этой популяции наблюдается при двух связанных условиях: синдром диффузного инфильтративного лимфоцитоза (СДИЛ) и связанный с ВИЧ синдром лимфоцитоза CD8+ (1,2). CD8 является маркером Т-клеток, который часто проявляется вместе с CD4 и распознается в большинстве Т-клеточных злокачественных опухолях, например при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и анапластической крупноклеточной лимфоме (3).

Т-клеточный лейкоз взрослых достаточно часто присутствуют в организме не проходящих лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающим фенотипом CD4+. С другой стороны наблюдалось резкое увеличение самопроизвольного распространения опухоли, что преобладает с лимфоцитами CD8+ у пациентов NHIH. Таким образом, размножение клона HTLV-1 положительных лимфоцитов CD8+ и CD4+ происходит с использованием двух разных механизмов. Поэтому инфекция HTLV-1 устанавливает предлейкозный фенотип, который ограничен инфицированными CD4+ клонами (4).

Т-клетки CD8+ Т участвуют в инициации, распространении и регулировании нескольких патогенных аутоиммунных реакций. Аутореактивные Т-клетки CD8+ также могут обеспечивать аутоиммунитет, секретируя цитокины, способные повышать восприимчивость целевых клеток к цитотоксичности, или секретируя хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в область аутоиммунитета. Кроме того, было выявлено, что аутореактивные Т-клетки CD8+ уменьшают аутоиммунные реакции. Т-клетки CD8+ участвуют в патогенезе не менее чем 30 аутоиммунных нозологических единиц в основном за счет цитотоксического воздействия на различные целевые клетки (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD8-PC5+	50	33,12	10,08	30

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD8 является димером с дисульфидной связью, который существует либо в виде гомодимера CD8α, либо в виде гетеродимера CD8αβ. CD8β необходим для поверхностной экспрессии CD8α. Молекулярный вес каждого мономера α и β составляет примерно 32–34 kDa (6, 7). CD8 связывается с неполиморфным доменом (α3-доменом) молекул MHC класса I (8). Молекула CD8 присутствует в поднаборе Т-клеток лимфоцитов периферийной крови человека. Поднабор NK-клеток экспрессирует антиген CD8, но с малой и средней плотностью экспрессии (9).

Гомодимер CD8α экспрессируется NK-клетками и Т-клетками γδ+. CD8 также присутствует в большинстве тимоцитов, где он часто коэкспрессирует с CD4, а также в субпопуляции костномозговых клеток. Молекула CD8 взаимодействует с рецептором Т-клетки (TCR) в качестве корецептора для антигенраспознающей клетки, ограниченной MHC класса I (10, 11). CD8 широко используется как маркер цитотоксических Т-лимфоцитов.

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (12).

B9.11 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD8 на первом International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека), который проводился в Paris, Франция, в 1982 г. (13, 14)

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD8-PC5 +	12	33,6	2,7	8

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD8-PC5	Y = 0,9773 X + 0,4946	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD10
Клон	ALB1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 2,5 - 4,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD10-FITC

REF A07759 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD10, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD10, который также носит название неприлизин, представляет собой металлоэндопептидазу клеточной поверхности с молекулярным весом 100 кД, которая инактивирует множество биологически активных пептидов. Первоначально он был идентифицирован как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA) и считался опухоль-специфическим. Антиген CD10 экспрессируется на поверхности множества нормальных и опухолевых клеток (1, 2). CD10 обнаруживается на клетках острого лимфоидного лейкоза (ALL), клетках, которые происходят от предшественников В-лимфоцитов, и сообщалось, что он экспрессируется на клетках лимфобластной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы, на поверхности нормальных ранних лимфоидных клеток-предшественников, незрелых В-клеток в костном мозге взрослых и В-клетках зародышевого центра в лимфоидной ткани (3, 4).

CD10 с экспрессией ICOS позволяет дифференцировать ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL) от других Т-клеточных лимфом (CD10–) (5; 6). Кроме того, CD10 может помочь дифференцировать лимфому Беркитта (BL) и CD10+ диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (7, 8). В дополнение к ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме, лимфоме Беркитта и диффузной В-крупноклеточной лимфоме, другие лимфомы могут быть CD10+, такие как лимфома из клеток мантии (9), маргинальной зоны (10) и редкие CD5+ CD10+ лимфомы (11).

Оценка экспрессии CD10 с использованием многопараметрической проточной цитометрии с анализом кластеров является высокочувствительной и специфической для диагностики фолликулярной лимфомы, в частности, когда недостаточно ткани для заключительного диагноза (12). CD10 обычно отрицательный при AML, CLL, EBV+ лимфопролиферативных заболеваниях, лимфоплазмоцитарном, из клеток мантии и маргинальной зоны. Яркая экспрессия CD10, связанная с ярким Bcl-2, может представлять колонизацию фолликулярной лимфомы, поэтому рекомендуется определение стадии опухоли (13).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10-FITC+	50	1,50	2,14	143

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10-FITC+	50	95,31	3,56	3,73

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Ген CALLA кодирует трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярным весом 100 кД. Родственные CALLA последовательности ДНК обнаружены на хромосоме человека 3J (14). CALLA, (CD10), был описан как поверхностный фермент, экспрессируемый на ранних лимфоидных клетках-предшественниках и нейтрофилах, и был идентифицирован как металлопротеаза цинка, нейтральная эндопептидаза 24.11 (NEP, «энкефалиназа»). Известно, что фермент CD10 гидролизирует множество биологически активных пептидов, в том числе мет-энкефалин, формил-Met-Leu-Phe (f-MLP) и вещество P, которые участвуют в процессе дифференцировки и созревания клеток.

Моноклональные антитела ALB1 были изучены во время первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г. (15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD10-FITC +	12	1,44	0,17	11,6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((MOLT4)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD10-FITC	Y = 0,98 X + 1,18	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD10
Клон	ALB1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD10-PE

REF A07760 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD10, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD10, который также носит название неприлизин, представляет собой металлоэндопептидазу клеточной поверхности с молекулярным весом 100 кД, которая инактивирует множество биологически активных пептидов. Первоначально он был идентифицирован как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA) и считался опухоль-специфическим. Антиген CD10 экспрессируется на поверхности множества нормальных и опухолевых клеток (1, 2). CD10 обнаруживается на клетках острого лимфоидного лейкоза (ALL), клетках, которые происходят от предшественников B-лимфоцитов, и сообщалось, что он экспрессируется на клетках лимфобластной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы, на поверхности нормальных ранних лимфоидных клеток-предшественников, незрелых B-клеток в костном мозге взрослых и B-клетках зародышевого центра в лимфоидной ткани (3, 4).

CD10 с экспрессией ICOS позволяет дифференцировать ангиоиммунобластную T-клеточную лимфому (AITL) от других T-клеточных лимфом (CD10–) (5; 6). Кроме того, CD10 может помочь дифференцировать лимфому Беркитта (BL) и CD10+ диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (7, 8). В дополнение к ангиоиммунобластной T-клеточной лимфоме, лимфоме Беркитта и диффузной B-крупноклеточной лимфоме, другие лимфомы могут быть CD10+, такие как лимфома из клеток мантии (9), маргинальной зоны (10) и редкие CD5+ CD10+ лимфомы (11).

Оценка экспрессии CD10 с использованием многопараметрической проточной цитометрии с анализом кластеров является высокочувствительной и специфической для диагностики фолликулярной лимфомы, в частности, когда недостаточно ткани для заключительного диагноза (12). CD10 обычно отрицательный при AML, CLL, EBV+ лимфопролиферативных заболеваниях, лимфоплазмоцитарном, из клеток мантии и маргинальной зоны. Яркая экспрессия CD10, связанная с ярким Bcl-2, может представлять колонизацию фолликулярной лимфомы, поэтому рекомендуется определение стадии опухоли (13).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10-PE+	50	1,50	2,14	143

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10-PE+	50	95,31	3,56	3,73

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Ген CALLA кодирует трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярным весом 100 кД. Родственные CALLA последовательности ДНК обнаружены на хромосоме человека 3J (14). CALLA, (CD10), был описан как поверхностный фермент, экспрессируемый на ранних лимфоидных клетках-предшественниках и нейтрофилах, и был идентифицирован как металлопротеаза цинка, нейтральная эндопептидаза 24.11 (NEP, «энкефалиназа»). Известно, что фермент CD10 гидролизирует множество биологически активных пептидов, в том числе мет-энкефалин, формил-Met-Leu-Phe (f-MLP) и вещество P, которые участвуют в процессе дифференцировки и созревания клеток.

Моноклональные антитела ALB1 были изучены во время первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г. (15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD10-PE +	12	1,73	0,16	9,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((MOLT4)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD10-PE	Y = 0,99 X + 0,26	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD10
Клон	ALB1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human Leukemia cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD10-PC5

REF A07761 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD10, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD10, который также носит название неприлизин, представляет собой металлоэндопептидазу клеточной поверхности с молекулярным весом 100 кД, которая инактивирует множество биологически активных пептидов. Первоначально он был идентифицирован как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA) и считался опухоль-специфическим. Антиген CD10 экспрессируется на поверхности множества нормальных и опухолевых клеток (1, 2). CD10 обнаруживается на клетках острого лимфоидного лейкоза (ALL), клетках, которые происходят от предшественников B-лимфоцитов, и сообщалось, что он экспрессируется на клетках лимфобластной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы, на поверхности нормальных ранних лимфоидных клеток-предшественников, незрелых B-клеток в костном мозге взрослых и B-клетках зародышевого центра в лимфоидной ткани (3, 4).

CD10 с экспрессией ICOS позволяет дифференцировать ангиоиммунобластную T-клеточную лимфому (AITL) от других T-клеточных лимфом (CD10–) (5; 6). Кроме того, CD10 может помочь дифференцировать лимфому Беркитта (BL) и CD10+ диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (7, 8). В дополнение к ангиоиммунобластной T-клеточной лимфоме, лимфоме Беркитта и диффузной B-крупноклеточной лимфоме, другие лимфомы могут быть CD10+, такие как лимфома из клеток мантии (9), маргинальной зоны (10) и редкие CD5+ CD10+ лимфомы (11).

Оценка экспрессии CD10 с использованием многопараметрической проточной цитометрии с анализом кластеров является высокочувствительной и специфической для диагностики фолликулярной лимфомы, в частности, когда недостаточно ткани для заключительного диагноза (12). CD10 обычно отрицательный при AML, CLL, EBV+ лимфопролиферативных заболеваниях, лимфоплазмоцитарном, из клеток мантии и маргинальной зоны. Яркая экспрессия CD10, связанная с ярким Bcl-2, может представлять колонизацию фолликулярной лимфомы, поэтому рекомендуется определение стадии опухоли (13).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10-PC5+	50	1,50	2,14	143

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD10-PC5+	50	95,31	3,56	3,73

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональные антитела ALB1 были изучены во время первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г. (14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты + CD10-PC5	12	1,22	0,18	14,6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((MOLT4)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD10-PC5	Y = 0,99 X + 0,69	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD13
Клон	SJ1D1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	KG1a cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD13-PE

REF A07762 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD13, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD13 присутствует на клетках миелоидного происхождения, а также на некоторых их гемопоэтических клетках-предшественниках. Данный маркер рекомендуется для иммунофенотипирования острых миелоидных лейкозов (AML) (1,2). Его использование, параллельно с другими миелоидными маркерами (миелопероксидазой и CD33), с B-клеточных линий (CD79 и CD19) и с T-клеточных линий (CD3 и CD7), позволяет идентифицировать более 98% случаев острых лейкозов (1). Для классификации AML было предложено использование оценок. В этом случае рекомендуется сопутствующее использование других миелоидных маркеров (например, CD65, CD117, даже CD14, CD15, CD41, CD61, CD64 и гликофорина A) (3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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 :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD13-PE+	50	92,7	6,7	7,2

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD13-PE+	50	99,3	0,8	0,8

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD13, известная также как аминопептидаза N (APN), представляет собой трансмембранную металлопротеазу типа II с молекулярным весом 150–170 кДа. Данная молекула имеет экстенсивную внеклеточную последовательность и короткую внутрицитоплазматическую область. Молекула CD13 связывается как гомодимер нековалентным образом на поверхности клеток (4). Антиген CD13 экспрессирован в ранней грануло-моноцитарной линии (моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы) и их коммитированных клетках-предшественниках (промежуточные клетки-предшественники, формирующие смешанные грануло-моноцитарные колонии, или CFU-GM) (4,5,6,7).

Молекула CD13 также экспрессирована на клетках не-кроветворных тканей, например, на эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев; клетках, формирующих кисточковую кайму кишечника; эндотелиальных клетках; фибробластах; стромальных клетках костного мозга; остеокластах и базальных клетках желчных протоков (8).

Моноклональное антитело SJ1D1 реагирует в периферической крови с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами. Оно было отнесено к CD13 во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Оксфорде, в Великобритании, в 1986 г. (код WS: 285, раздел M) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Моноциты + CD13-PE	12	99,6	0,4	0,3
Гранулоциты + CD13-PE	12	100,0	0,0	0,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((KG-1a)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD13-PE	Y = 1,00 X + 0,10	0,9997

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD13
Клон	Immu 103,44
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Mixture of cell lines KG-1a and TF1
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD13-PC5

REF A07763 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD13, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD13 представляет собой ранний индикатор миелоидной линейки. Экспрессия CD13 характерна для области клеток-предшественников костного мозга, он экспрессируется очень рано в процессе дифференциации миелоидной линии до того, как клетки демонстрируют какие бы то ни было морфологические признаки миелоидной дифференциации. Этот индикатор рекомендуется для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML) (1, 2). Рекомендуется одновременная оценка экспрессии других миелоидных маркеров (например, CD65, CD117, CD14, CD15, CD41, CD61, CD64 и гликофорин A) для классификации AML (3). Использование CD13 вместе с миелоидными маркерами (миелопероксидаза и CD33), маркерами B-клеток (CD79 и CD19) и маркерами T-клеток (CD3 и CD7) позволяет идентифицировать более 98% острых лейкозов (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 13 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD13-PC5+	13	98,1	1,4	1,4

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD13-PC5+	13	99,7	0,2	0,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD13, также известная N-аминопептидазой (APN), представляет собой трансмембранную металлопротеазу типа II с молекулярным весом в 150 – 170 kDa. Эта молекула имеет протяженную внеклеточную последовательность и короткую внутрицитоплазматическую область. Молекула CD13 связывает гомодимер нековалентным способом на поверхности клеток (4). Антиген CD13 экспрессируется рано в грануломоноцитарной линии (моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы) и их коммитированных клетках-предшественниках (промежуточные клетки-предшественники, образующие смешанные грануло-моноцитарные колонии или CFU-GM) (4), 5, 6, 7). Молекула CD13 также экспрессируется на клетках не кроветворных тканей, например на эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев, клетках, составляющих щеточную кайму кишечника, эндотелиальных клетках, фибробластах, стромальных клетках костного мозга, остеокластах и базальных клетках из желчных протоков (8). Моноклональное антитело Immu103.44 вступает в периферической крови в реакцию с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами. Оно было отнесено к CD13 во время 3-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (код WS: 285, секция M) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Моноциты + CD13-PC5	12	99,3	0,3	0,3
Гранулоциты + CD13-PC5	12	100,0	0,1	0,1

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((KG-1a)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD13-PC5	Y = 0,99 X + 0,32	0,9999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD14
Клон	RMO52
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Isolated human monocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD14-PE

REF A07764 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD14, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и умеренно – на нейтрофилах, подгруппе популяции дендритных клеток и макрофагах. CD14 – полезный индикатор для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML). Одновременный анализ экспрессии антигенов CD14 и CD13 помогает дифференцировать M4 AML (1) с моноцитарной онтогенностью (CD14+CD13+ фенотип) от M2 AML с немоноцитарной онтогенностью (CD14–CD13+ фенотип) (2; 3; 4; 5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A09142.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09142.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14-PE+	50	91,0	6,3	7

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14-PE+	50	98,5	2,2	2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD14 представляет собой белок молекулярным весом в 53 – 55 kDa, связанных в мембране с помощью группы гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (6). Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и макрофагах и умеренно — на многоядерных нейтрофилах периферической крови; он также присутствует на плевральных фагоцитах и дендритных ретикулярных клетках. CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарной линейки и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Он отсутствует в Т-лимфоцитах, а также в NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (7).

Моноклональное антитело RMO52 было отнесено к CD14 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: MA62, секция M) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты + CD14-PE	12	98,3	0,5	0,5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((activated THP1)) и клетки отрицательной линии ((FRN 3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD14-PE	Y = 0,996 X + 0,128	0,9993

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD14
Клон	RMO52
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Isolated human monocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD14-PC5

REF A07765 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD14, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и умеренно – на нейтрофилах, подгруппе популяции дендритных клеток и макрофагах. CD14 – полезный индикатор для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML). Одновременный анализ экспрессии антигенов CD14 и CD13 помогает дифференцировать M4 AML (1) с моноцитарной онтогенностью (CD14+CD13+ фенотип) от M2 AML с немоноцитарной онтогенностью (CD14–CD13+ фенотип) (2; 3; 4; 5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A09148.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09148.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 19 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14-PC5+	19	94,3	4,5	4,8

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14-PC5+	19	49,3	17,2	34,9

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD14 представляет собой белок молекулярным весом в 53 – 55 kDa, связанных в мембране с помощью группы гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (6). Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и макрофагах и умеренно — на многоядерных нейтрофилах периферической крови; он также присутствует на плевральных фагоцитах и дендритных ретикулярных клетках. CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарной линейки и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Он отсутствует в Т-лимфоцитах, а также в NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (7).

Моноклональное антитело RMO52 было отнесено к CD14 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: MA62, секция M) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты + CD14-PC5	12	96,3	0,8	0,8

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((activated THP1)) и клетки отрицательной линии ((FRN 3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD14-PC5	Y = 0,952 X + 0,504	0,9987

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD16
Клон	3G8
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human neutrophils
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD16-PE

REF A07766 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD16, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD16 остается важнейшим индикатором для определения подгрупп популяций «природных клеток-киллеров» при злокачественных заболеваниях крови, трансплантациях, аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитах, а также для идентификации различных функциональных популяций NK в реакциях на воспаление и микробные инфекции (1,2).

При злокачественных заболеваниях кроветворной системы экспрессия CD16 на определенных типах клеток лейкемии имеет значение при определении прогноза (3,4). Популяция, определенная как T NK-подобные клетки CD16+, оказывается полезной при определении активности болезни при некоторых типах CLL (5). Важно то, что недавние клинические исследования выявили, что CD16 является потенциальным кандидатом для разработки новой иммунотерапии для борьбы с лейкемией B-клеток и AML на основе клеток (6,7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16-PE+	20	10,18	4,17	244

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16-PE+	20	23,59	6,98	30

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16-PE+	20	97,87	1,62	2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD16 представляет собой низкоаффинный рецептор IgG (FcγRIII), связывающий иммунные комплексы, но не мономерный IgG. Антиген CD16 существует в двух различных формах, зашифрованных в двух различных генах: FcγRIIIA (или III-2) и FcγRIIIB (или III-1). Генетическая гетерогенность CD16 приводит к появлению альтернативных молекул, связанных с мембраной. Одна из них – трансмембранная форма (FcγRIIIA, 50 – 65 kDa), экспрессированная на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Другая — форма, связанная с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) (FcγRIIIB, 48 kDa), экспрессируемая только на нейтрофилах (8,9).

Было показано, что антиген CD16 не может быть нековалентно связан в мембране NK-клеток с цепью 16 kDa CD3ζ (10) или с двумерной цепью FcRγ (11). Моноклональное антитело 3G8 (mAb) связывается с FcγRIIIA, а также с FcγRIIIB (сильно). Было показано, что оно почти полностью блокирует связывание димеров IgG с FcγRIIIB (12). Эксперименты, в которых к молекуле FcγRIIIB были применены аминокислотные мутации, показали, что на 3G8 mAb оказывают влияние замены Lys162 и Val164 в цикле FG проксимального по отношению к мембране области молекулы, похожей на Ig (13). 3G8 mAb была присвоена CD16 во время Пятого семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1993 году (14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты + CD16-PE	12	8,96	0,36	4,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((GRANU)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD16-PE	Y = 0,98 X + 0,54	0,9992

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD16
Клон	3G8
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human neutrophils
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD16-PC5

REF A07767 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD16, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD16 остается важнейшим индикатором для определения подгрупп популяций «природных клеток-киллеров» при злокачественных заболеваниях крови, трансплантациях, аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитах, а также для идентификации различных функциональных популяций NK в реакциях на воспаление и микробные инфекции (1,2).

При злокачественных заболеваниях кроветворной системы экспрессия CD16 на определенных типах клеток лейкемии имеет значение при определении прогноза (3,4). Популяция, определенная как T NK-подобные клетки CD16+, оказывается полезной при определении активности болезни при некоторых типах CLL (5). Важно то, что недавние клинические исследования выявили, что CD16 является потенциальным кандидатом для разработки новой иммунотерапии для борьбы с лейкемией B-клеток и AML на основе клеток (6,7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16-PC5+	20	12,56	6,48	52

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16-PC5+	20	20,38	9,35	46

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD16-PC5+	20	97,80	1,65	2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD16 представляет собой низкоаффинный рецептор IgG (FcγRIII), связывающий иммунные комплексы, но не мономерный IgG. Антиген CD16 существует в двух различных формах, зашифрованных в двух различных генах: FcγRIIIA (или III-2) и FcγRIIIB (или III-1). Генетическая гетерогенность CD16 приводит к появлению альтернативных молекул, связанных с мембраной. Одна из них – трансмембранная форма (FcγRIIIA, 50 – 65 kDa), экспрессированная на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Другая — форма, связанная с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) (FcγRIIIB, 48 kDa), экспрессируемая только на нейтрофилах (8,9).

Было показано, что антиген CD16 не может быть нековалентно связан в мембране NK-клеток с цепью 16 kDa CD3ζ (10) или с двумерной цепью FcRγ (11). Моноклональное антитело 3G8 (mAb) связывается с FcγRIIIA, а также с FcγRIIIB (сильно). Было показано, что оно почти полностью блокирует связывание димеров IgG с FcγRIIIB (12). Эксперименты, в которых к молекуле FcγRIIIB были применены аминокислотные мутации, показали, что на 3G8 mAb оказывают влияние замены Lys162 и Val164 в цикле FG проксимального по отношению к мембране области молекулы, похожей на Ig (13). 3G8 mAb была присвоена CD16 во время Пятого семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1993 году (14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты + CD16-PC5	12	22,23	0,51	2,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((GRANU)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD16-PC5	Y = 0,98 X + 0,57	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY18 Lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4,5 - 7,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-FITC

REF A07768 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения B-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для B-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев B-клеточных новообразований и моноклонального B-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях B-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую B-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение B-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона B-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с B-клеточным острым лимфобластным лейкозом (B-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов B-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими B-/T-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка B-клеток, а также степени функционального восстановления B-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19-FITC+	50	10,80	5,72	52,96

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим C-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов B-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов B-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых B-клеток.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD19-FITC +	12	12,28	0,44	3,6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((HPBALL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19-FITC	Y = 0,97 X + 1,19	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY18 Lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-PE

REF A07769 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения B-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для B-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев B-клеточных новообразований и моноклонального B-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях B-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую B-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение B-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона B-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с B-клеточным острым лимфобластным лейкозом (B-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов B-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими B-/T-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка B-клеток, а также степени функционального восстановления B-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19-PE+	50	10,80	5,72	52,96

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим C-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов B-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов B-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых B-клеток.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD19-PE +	12	13,30	0,57	4,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((HPBALL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19-PE	Y = 0,99 X + 0,59	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY18 Lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-ECD

REF A07770 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения В-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в В-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников В-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для В-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев В-клеточных новообразований и моноклонального В-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях В-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую В-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение В-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона В-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов В-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими В-/Т-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка В-клеток, а также степени функционального восстановления В-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07797.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19-ECD+	50	10,80	5,72	52,96

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов В-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов В-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых В-клеток.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD19-ECD +	12	11,21	0,77	6,9

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((HPBALL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19-ECD	Y = 0,98 X +0,84	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY18 Lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-PC5

REF A07771 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения В-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в В-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников В-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для В-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев В-клеточных новообразований и моноклонального В-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях В-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую В-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение В-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона В-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов В-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими В-/Т-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка В-клеток, а также степени функционального восстановления В-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 49 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19-PC5+	49	12,74	6,26	49,1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов В-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов В-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых В-клеток.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD19-PC5 +	12	5,03	0,768	15,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((HPBALL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19-PC5	Y = 0,95 X + 0,80	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4,5 - 6,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-FITC

REF A07772 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD20, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A12689.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A12689.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD20-FITC+	50	7,4	3,2	43

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD20-FITC +	12	16,4	0,9	5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((MOLT4)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD20-FITC	Y = 0,99 X + 0,80	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-PC5

REF A07773 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD20, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A09148.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09148.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD20-PC5+	50	10,5	4,3	41

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD20-PC5 +	12	9,1	0,5	6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((red blood cells)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD20-PC5	Y = 0,94 X +0,71	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD25
Клон	B1.49.9
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Alloactivated T lymphocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD25-PE

REF A07774 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD25, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Гетеротримерный рецептор IL2 (IL2RA, IL2RB и IL2RG) играет важную роль в поддержании работы иммунной системы (1,2). Для аналитической проточной цитометрии антиген CD25 играет критически важную роль в идентификации ряда фенотипических подмножеств, включая активированные Т-клетки, Т Reg-клетки, и дифференциальной диагностике лимфопролиферативных заболеваний и других функциональных субпопуляций (3).

Активированные Т-клетки можно отслеживать методом проточной цитометрии на основании поверхностных молекул, для которых обычно характерно повышающее регулирование, например CD25 (4). Действие иммуносупрессивных препаратов на активацию Т-клеток можно зарегистрировать непрямым анализом клеточной функции или прямым мониторингом активированных Т-клеток в цельной крови методом проточной цитометрии. Регуляторные Т-клетки (Treg-клетки), определяемые при экспрессии CD4(+) CD25(+), фактора транскрипции, FoxP3, выявляют супрессорную активность (5). IL2RA конституционно экспрессируется на регуляторных Т-клетках. Супрессорная активность Treg-клеток является как контактно-зависимой, так и цитокин-независимой. Treg-клетки играют центральную роль в поддержании аутотолерантности и гомеостаза ткани. Нарушение Treg сообщалось при ряде аутоиммунных состояний у человека. Истощение Treg-клеток приводит к возникновению множества аутоиммунных заболеваний (6,7).

Treg-клетки вносят важный вклад в развитие иммунной толерантности к опухолям и играют критическую роль в индукции толерантности к ассоциированным с опухолями антигенам и подавлении противоопухолевого иммунитета. Истощение Treg-клеток или блокирование их роли подавления иммунитета может усилить противоопухолевое действие. Недавние свидетельства предполагают, что Treg-клетки могут отвечать за сбой противоопухолевого иммунитета хозяина вследствие подавления цитотоксических Т-клеток (8,9). Естественным образом возникающие Treg-клетки поддерживают иммунологическую аутотолерантность и предотвращают ряд аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и системная красная волчанка. Treg-клетки использовались для лечения клинически аутоиммунного ревматоидного заболевания путем наращивания натуральных специфичных к аутоантигенам Treg-клеток ex vivo и последующего переноса обратно к хозяину. Во всех этих процедурах важную роль играют использование и обнаружение клеток CD25+ (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A09142.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09142.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD25-PE+	50	10,88	5,12	47,08

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Обладающий высоким сродством рецептор IL-2 (IL-2R) представляет собой тримерный комплекс, состоящий из трех полипептидных цепей, α (IL-2Rα, Tac, p55 или CD25), β (IL-2Rβ, p75 или CD122) и γ (IL-2Rγ или p64). Т-лимфоциты экспрессируют рецептор IL-2, обладающий промежуточным сродством, который представляет собой комплекс β/γ или α/γ цепей. Цепи IL-2Rβ и IL-2Rγ принимают участие в опосредованном IL-2 клеточном сигнальном пути (11,12,13). Молекула CD25 (известная как Tac-антиген и рецептор интерлейкина-2 α IL-2Rα) в большом количестве экспрессируется на регуляторных CD4-положительных Т-лимфоцитах и не обнаруживается на покоящихся CD8-положительных лимфоцитах. Однако все активированные Т-лимфоциты экспрессируют белок CD25. Подмножество В-лимфоцитов (CD20-положительных) экспрессирует антиген CD25. Гранулоциты, моноциты, NK-клетки, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют CD25 (11).

Моноклональное антитело (mAb) B1.49.9 было отнесено к кластеру дифференцирования CD25 на 2nd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (2-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: T141, секция T) (14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD25-PE +	12	14,79	0,41	2,8

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((FEV 20,3)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD25-PE	Y = 0,99 X + 0,55	0,9996

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD33
Клон	D3HL60.251
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	HL60 human cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Affinity chromatography
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD33-PE

REF A07775 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD33, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ антигена CD33 помогает в идентификации бластных клеток миелоидного происхождения (нормальных и злокачественных) и аберрантно экспрессируется популяциями B и T лимфобластной лейкемии/лимфомы (1, 2, 3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD33-PE+	10	91,71	4,92	5

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD33-PE+	10	99,52	0,47	0,47

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD33 является трансмембранным мономерным гликопротеином с молекулярным весом 67 кДа. Эта молекула относится к семейству сиалоадгезина: ее адгезивные свойства зависят от присутствия сиаловой кислоты (7). Молекула CD33 экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками из миеломоноцитарных и эритроидных линий клеток, но отсутствует в клетках лимфоидного происхождения (8). Она значительно экспрессируется на моноцитах и незначительно на циркулирующих гранулоцитах. Моноклональное антитело D3HL60.251 было отнесено к CD33 во время 4-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Вене, Австрия, в 1989 году (код WS: 504, секция M) (7).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Моноциты + CD33-PE	12	99,32	0,33	0,3
Гранулоциты + CD33-PE	12	100	0,00	0,00

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((U937)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD33-PE	Y = 0,99 X - 0,49	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-PE

REF A07776 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD34, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от BM-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

В целом, CD34 рассматривается как поверхностный антиген, подходящий для селекции субпопуляций клеток-предшественников из более крупных клеточных популяций, в том числе клеток мезенхимы, и не связанный только с гематопоэтическими и эндотелиальными клетками (13). Клетки CD34+ из многих типов ткани могут представлять собой источник клеток-предшественников, которые могут использоваться клинически в регенеративных медицинских стратегиях (14, 15).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD34-PE+	50	0,088	0,072	82

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (16).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD34-PE +	12	8,2	0,12	1,5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (KG-1a) и клетки отрицательной линии и периферическую кровь 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 периферическую кровь находилось в диапазоне от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD34-PE	Y = 0,97 X + 0,15	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-PC5

REF A07777 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD34, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от ВМ-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

В целом, CD34 рассматривается как поверхностный антиген, подходящий для селекции субпопуляций клеток-предшественников из более крупных клеточных популяций, в том числе клеток мезенхимы, и не связанный только с гематопоэтическими и эндотелиальными клетками (13). Клетки CD34+ из многих типов ткани могут представлять собой источник клеток-предшественников, которые могут использоваться клинически в регенеративных медицинских стратегиях (14, 15).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD34-PC5+	50	0,036	0,048	133

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (16).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Лимфоциты	Номер	Mean (%)	SD	CV (%)
CD34+	12	7,5	0,3	4,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (KG-1a) и клетки отрицательной линии и периферическую кровь 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 периферическую кровь находилось в диапазоне от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD34-PC5	Y = 0,99 X + 1,85	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD38
Клон	T16
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	PHA-activated peripheral blood lymphocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4,0 - 5,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD38-FITC

REF A07778 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD38, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций лейкоцитов, экспрессирующих молекулу CD38 при заболеваниях иммунной системы, приводящих к повышенной экспрессии молекулы CD38: иммунодефициты и вирусные инфекции (1). Последующее наблюдение и иммунофенотипирование популяций лейкоцитов CD38+ при злокачественных дискразиях крови (1,2,3,4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 52 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38-FITC+	52	33,54	11,80	35

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38-FITC+	52	94,18	4,28	5

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38-FITC+	52	99,32	0,88	1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD38, также называемый антигеном T10, представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, N-концевая часть которого цитоплазматическая.
Этот гликопротеин с молекулярным весом, близким к 45 кДа, экспрессируется на большом числе гемопоэтических клеток: его распределение зависит от этапа дифференциации и степени клеточной активации. Антиген CD38 обычно определяется как маркер активации и дифференциации нормальных и злокачественных клеток крови (1).

Точнее говоря, на уровне лимфоцитарной дифференциации B-клеток экспрессия молекулы CD38 появляется на ранних этапах и исчезает во время созревания B-клеток, а затем снова появляется на финальном этапе дифференциации (плазмоцитарный этап). Молекула CD38 экспрессируется активированными T- и B-клетками, моноцитами, большинством NK-клеток, медуллярными тимоцитами (5,6), а также на тромбоцитах (6) и эритроцитах (7). На циркулирующих T-лимфоцитах обнаружена очень слабая экспрессия CD38.

Моноклональное тело T16 было отнесено к CD38 во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Oxford, England, в 1986 г. (код WS: 915, раздел B) (8).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD38-FITC +	12	40,28	0,88	2,2
Моноциты + CD38-FITC	12	98,64	0,27	0,3
Гранулоциты + CD38-FITC	12	99,99	0,03	0,00

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD38-FITC	Y = 0,99 X + 0,18	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD38
Клон	LS198-4-3
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human T cell line HUT 78
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD38-PE

REF A07779 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD38, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций лейкоцитов, экспрессирующих молекулу CD38 при заболеваниях иммунной системы, первоначально привели к повышенной экспрессии молекулы CD38 по отношению к активации клеток при иммунодефиците, вирусных инфекциях и B-клеточных новообразованиях (B-CLL и плазмоклеточная дискразия) (1,2,3,4). У больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV)/синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS) экспрессия CD38 на T-клетки связана с активацией клеток и потенциально полезна для анализа иммунологического статуса (5,6). Клиническая деятельность подтверждает, что клоны миеломных клеток действительно экспрессируют CD38 у большинства пациентов, хотя с различными значениями поверхностной плотности (7). Существует связь между экспрессией CD38 клетками CLL и более активным развитием болезни (8,9,10). CD38 экспрессируется у большинства более агрессивных с клинической точки зрения лейкозных клонов, требующих лечения (9,10). В настоящее время CD38 выбран в качестве основного средства для mAb-зависимой терапии (11)

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 52 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38-PE+	52	61,87	10,77	17

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38-PE+	52	99,03	1,13	1

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38-PE+	52	99,87	0,3	0,00

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD38, также называемый антигеном T10, представляет собой трансмембранный гликопротеин с одной цепью типа II, у которого цитоплазматическая конечная N-секция (1,12). Этот гликопротеин с молекулярным весом, близким к 45 kDa, экспрессируется в большом числе гемопоэтических клеток: его распределение зависит от этапа дифференциации и степени клеточной активации. Функциональная молекула представляет димер или мультимер (13,14,15). Одной из функций, которую первоначально приписывали CD38, является регуляция активации и пролиферации человеческих Т-лимфоцитов (5,6 и 16).

Лигирование CD38 агонистическими моноклональными антителами (mAb) вызывает быстрое выделение Ca2+ и запускает процесс фосфорилирования каскада интрацеллюлярный субстратов, что приводит к активации комплекса NF-κB (17,18). В слое В-клеток CD38 экспрессируется на высоких уровнях только костным мозгом с коммитированными клетками-предшественниками (ранние BM-клетки — CD38–) и В-лимфоцитами в герминативных центрах, плазмацитами на последней стадии дифференцировки и в активированных миндалинах (8,9,10). Напротив, зрелые девственные В-лимфоциты и В-лимфоциты памяти экспрессируют низкие уровни этой молекулы. Точнее говоря, на уровне лимфоцитарной дифференциации В-клеток экспрессия молекулы CD38 появляется на ранних этапах и исчезает во время созревания В-клеток, а затем снова появляется на финальном этапе дифференциации (плазмоцитарный этап).

Молекула CD38 экспрессируется активированными лимфоцитами Т- и В-клеток (19,20), моноцитами, большинством естественных клеток-убийц, медуллярными тимоцитами (21,22), а также в тромбоцитах (23) и эритроцитах (24). В циркулирующих лимфоцитах Т-клеток, обнаружена очень слабая экспрессия CD38. Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: T-CD38.06, раздел T) для CD38 было назначено моноклональное антитело LS198 (24).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD38-PE +	12	67,45	1	1,5
Моноциты + CD38-PE	12	99,47	0,18	0,2
Гранулоциты + CD38-PE	12	99,98	0,06	0,1

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD38-PE	Y=0,99 X+0,37	0,9995

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (25).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (26).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD38
Клон	LS198-4-3
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human T cell line HUT 78
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD38-PC5

REF A07780 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD38, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций лейкоцитов, экспрессирующих молекулу CD38 при заболеваниях иммунной системы, первоначально привели к повышенной экспрессии молекулы CD38 по отношению к активации клеток при иммунодефиците, вирусных инфекциях и B-клеточных новообразованиях (B-CLL и плазмоклеточная дискразия) (1,2,3,4). У больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV)/синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS) экспрессия CD38 на T-клетки связана с активацией клеток и потенциально полезна для анализа иммунологического статуса (5,6). Клиническая деятельность подтверждает, что клоны миеломных клеток действительно экспрессируют CD38 у большинства пациентов, хотя с различными значениями поверхностной плотности (7). Существует связь между экспрессией CD38 клетками CLL и более активным развитием болезни (8,9,10). CD38 экспрессируется у большинства более агрессивных с клинической точки зрения лейкозных клонов, требующих лечения (9,10). В настоящее время CD38 выбран в качестве основного средства для mAb-зависимой терапии (11)

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 52 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38+	52	61,87	10,77	17

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38+	52	99,03	1,13	1

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD38+	52	99,87	0,3	0,00

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD38, также называемый антигеном T10, представляет собой трансмембранный гликопротеин с одной цепью типа II, у которого цитоплазматическая конечная N-секция (1,12). Этот гликопротеин с молекулярным весом, близким к 45 kDa, экспрессируется в большом числе гемопоэтических клеток: его распределение зависит от этапа дифференциации и степени клеточной активации. Функциональная молекула представляет димер или мультимер (13,14,15). Одной из функций, которую первоначально приписывали CD38, является регуляция активации и пролиферации человеческих Т-лимфоцитов (5,6 и 16).

Лигирование CD38 агонистическими моноклональными антителами (mAb) вызывает быстрое выделение Ca2+ и запускает процесс фосфорилирования каскада интрацеллюлярный субстратов, что приводит к активации комплекса NF-κB (17,18). В слое В-клеток CD38 экспрессируется на высоких уровнях только костным мозгом с коммитированными клетками-предшественниками (ранние ВМ-клетки — CD38–) и В-лимфоцитами в герминативных центрах, плазмацитами на последней стадии дифференцировки и в активированных миндалинах (8,9,10). Напротив, зрелые девственные В-лимфоциты и В-лимфоциты памяти экспрессируют низкие уровни этой молекулы. Точнее говоря, на уровне лимфоцитарной дифференциации В-клеток экспрессия молекулы CD38 появляется на ранних этапах и исчезает во время созревания В-клеток, а затем снова появляется на финальном этапе дифференциации (плазмоцитарный этап).

Молекула CD38 экспрессируется активированными лимфоцитами Т- и В-клеток (19,20), моноцитами, большинством естественных клеток-убийц, медуллярными тимоцитами (21,22), а также в тромбоцитах (23) и эритроцитах (24). В циркулирующих лимфоцитах Т-клеток, обнаружена очень слабая экспрессия CD38. Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: T-CD38.06, раздел T) для CD38 было назначено моноклональное антитело LS198 (24).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD38 +	12	60,07	0,6	1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Моноциты + CD38	12	96,41	0,46	0,5
Гранулоциты + CD38	12	99,99	0,03	0,00

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD38	Y = 0,98 X + 0,48	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (25).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (26).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD41
Клон	P2
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human platelets
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD41-PE

REF A07781 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет выполнить идентификацию и подсчет популяций тромбоцитов и лейкоцитов, экспрессирующих антиген CD41, который присутствует в биологических пробах человека, с использованием проточной цитометрии.

ПРИНЦИП
Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связывать антигенные детерминанты, экспрессированные тромбоцитами или лейкоцитами.

Специфическое окрашивание лейкоцитов или тромбоцитов выполняется путем инкубирования пробы с реагентом IOTest. После этого эритроциты удаляются с помощью лизирующей процедуры. Тромбоциты и лейкоциты, которые этот процесс не затрагивает, анализируются с помощью проточного цитометра.

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.

Флуоресценцию разграниченных таким образом тромбоцитов или лейкоцитов анализируют с целью различения положительно-окрашенных и неокрашенных событий. Результаты выражаются в виде процентного отношения положительных событий ко всем событиям, полученным в ходе селекции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций тромбоцитов или мегакариоцитов, экспрессирующих молекулу CD41 при заболеваниях, связанных с агрегацией тромбоцитов и/или клеточной адгезией. Последующее наблюдение и иммунофенотипирование клеточных популяций CD41+ при злокачественных дискразиях крови (1). Молекула CD41 является составной частью комплекса CD41/CD61, более известного под названием гликопротеин gpIIb-IIIa, который отсутствует или незначительно экспрессирован в случае тромбастении Glanzmann (2).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ
Антиген CD41 не экспрессируется на лейкоцитах из нормальной крови, что не позволяет проводить измерение лабораторной изменчивости данного параметра на основе лейкоцитов из периферической крови.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ
Моноклональное антитело (mAb) P2 распознает эпитоп молекулы CD41 (gpIIb), что зависит от экспрессии комплекса gpIIb-IIIa, сформированного с помощью гликопротеина CD61 (gpIIIa) (3,4). В результате клон P2 иммунопреципитирует комплекс gpIIb-IIIa с молекулярным весом 95–160 кДа (5). MAb P2 блокирует связывание фибриногена и ингибирует агрегацию тромбоцитов, вызванную тромбином, коллагеном и АДФ (4).

Во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (Код WS: 854, раздел P) для CD41 было назначено моноклональное антитело P2 (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ
В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений содержания положительно окрашенных клеток в образце (тромбоцитов). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
тромбоцитов CD41-PE+	12	82,91	2,15	2,6

Линейность
Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HEL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD41-PE	Y = 0,99 X + 1,94	0,9994

ОГРАНИЧЕНИЯ
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. 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. При определенных заболеваниях, таких как острая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может протекать медленно, быть неполным или даже невозможным. В этом случае, как и в случае с низким количеством тромбоцитов, предпочтительно провести тест на обогащенной тромбоцитами плазме (англ. platelet-enriched plasma, PEP).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ
Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов
Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,5 - 7,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-FITC

REF A07782 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-FITC+	10	99,80	0,15	0,16

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-FITC +	12	99,92	0,07	0,07

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((NAMALWA)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45-FITC	Y = 0,99 X + 0,62	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-PE

REF A07783 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PE+	10	99,03	0,78	0,78

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PE+	10	99,26	0,58	0,58

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PE+	10	99,89	0,09	0,09

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-PE+	12	98,53	0,25	0,00

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((NAMALWA)) и клетки отрицательной линии ((FRN 3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45-PE	Y=0,99 X-0,42	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-ECD

REF A07784 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07797.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-ECD+	50	95,39	3,21	3,00

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-ECD+	50	95,85	4,00	4,00

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-ECD+	50	98,49	2,18	2,00

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-ECD +	12	98,98	0,65	0,7

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((THP)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45-ECD	Y=0,98X+0,31	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).
8. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-PC5

REF A07785 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PC5+	10	97,17	3,57	3,67

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PC5+	10	95,89	5,79	6,03

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PC5+	10	99,01	0,97	0,97

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-PC5 +	12	99,89	0,09	0,09

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((NAMALWA)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45-PC5	Y=1,00X+1,06	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).
8. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45RA
Клон	ALB11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Acute T cell lymphoblastic leukaemia cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 6,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45RA-FITC

REF A07786 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD45RA, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Изоформы CD45RA экспрессируются на поверхности B- и NK-лимфоцитов, а также на субпопуляции T-клеток, часто оцениваемых как наивные и/или покоящиеся (1).
Антиген CD45RA присутствует на приблизительно 50% T-клеток CD4+ и приблизительно на 75% T-клеток CD8+ (1). CD45RA и CD45RO являлись первыми маркерами для дискриминации наивных T-клеток (в общих чертах, CD45RA+CD45RO–) от T-клеток памяти (в общих чертах, CD45RA–CD45RO+) (2). Плотность экспрессии изоформ CD45RA снижается во время активации T-клеток in vitro, в то время как экспрессии изоформы CD45RO продолжает увеличиваться (3,4). Однако более недавние исследования предполагают, что определенные T-клетки памяти CD8+ могут возвращаться назад по направлению к фенотипу CD45RA+ (5).

Во время высокоактивной антиретровирусной терапии (HAART) у пациентов, инфицированных HIV, наблюдается замедленное восстановление наивной субпопуляции T-клеток CD4+ CD45RA+ CD62L+ (6). Во время активной фазы иммунного ответа на вирус Эпштейна-Барр, эффективные T-клетки CD8+, специфические для вирусных антигенов, увеличиваются в количестве в 1 000 раз (2,7). В контексте иммунного ответа на меланомы у определенных пациентов может быть обнаружена значительная субпопуляция (> 5%) T-клеток CD8+CD45RA+CCR7–, которые демонстрируют ex vivo специфическую для опухоли цитолитическую активность (8).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45RA-FITC+	50	61,1	8,5	14

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45RA-FITC+	50	98,6	0,9	1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Семейство гликопротеинов CD45, которое экспрессируется на поверхности всех человеческих лейкоцитов, отсутствует в зрелых эритроцитах (9). Разные изоформы, составляющие антигены CD45, происходят от сплайсированных комбинаций экзонов 4, 5 и 6, которые кодируют детерминанты A, B и C соответственно. Антитела CD45RA распознают изоформы 210 и 220 кДа, интегрирующие по меньшей мере детерминанту A.

Моноклональное антитело (mAb) ALB11 реагирует с моноцитами, B- и NK-клетками, а также с субпопуляцией T-клеток. Моноклональное антитело ALB11 было отнесено к CD45RA во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Boston, USA, в 1993 г. (код WS: CD45.32, раздел T) (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45RA-FITC +	12	58,5	0,9	1,5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((KG-1a)) и клетки отрицательной линии ((PEER)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45RA-FITC	Y = 0,99 X +0,03	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45RO
Клон	UCHL1
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Human IL-2 dependent T-cell line
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45RO-PE

REF A07787 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD45RO, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD45 экспрессирует при большинстве лейколимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемические клоны. Различные изоформы CD45 имеют варьируемую степень экспрессии на лимфоидных или миелоидных клетках и являются специфичными для типа клетки и зависят от стадии дифференцировки, а также состояния активации клеток. У пациентов, инфицированных ВИЧ, отмечается более высокая восприимчивость субпопуляции Т-клеток памяти CD4+CD45RO+ к прикреплению (1) и репликации вируса (2). У пациентов, страдающих плоскоклеточной карциномой головы и шеи, эффекторные Т-клетки CD8+CD45RO–CD27+, которые присутствуют в кровотоке, чувствительны к апоптозу (3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A09142.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09142.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45RO-PE+	50	57,6	9,5	16

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45RO-PE+	50	98,5	1,2	1

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45RO-PE+	50	99,7	0,8	1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Общий антиген лейкоцитов (CD45) — трансмембранного типа белок тирозинфосфат, сильно гликированный, с пятью изоформами, экспрессирующийся в высоких концентрациях на ядросодержащих гематопоэтических клетках, от стволовых клеток до клеток памяти, за исключением мегакариоцита/тромбоцита и эритроидной серии. Изоформы CD45 (функционально похожие белки со схожей, но не идентичной последовательностью аминокислот), включая CD45RA, генерируются альтернативным сплайсингом мРНК экзонов 4 (CD45RA), 5 (CD45RB) и 6 (CD45RC), что приводит к изменениям во внеклеточном домене молекулы (4). Регуляторные Т-клетки CD45RA+ преобразуются в регуляторные Т-клетки CD45RO+ после активации (5,6). CD45RO присутствует в клетках памяти и активированных Т-клетках, гранулоцитах, моноцитах, макрофагах и кортикальных тимоцитах; в то время как большинства B- и NK-клеток являются отрицательными.

Моноклональное антитело UCHL1 было отнесено к CD45RO во время 4rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Vienna, Austria, в 1989 г. (код WS: N31, раздел: Non Lineage / Natural Killer (Без дифференцировки / натуральный киллер)) (7).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45RO-PE +	12	42,8	0,8	1,9

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((THP 1)) и клетки отрицательной линии ((FRN 3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45RO-PE	Y = 0,99 X +0,58	0,9999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD56
Клон	N901 (NKH-1)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human chronic myeloid leukemia (hCML) cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD56-PE

REF A07788 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD56, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Моноклональные антитела N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, который экспрессируется большинством натуральных киллеров (NK-клеток) периферической крови (1,2), а также субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3). NK-клетки характеризуются собственной и специфической цитотоксической активностью, которая проявляется, когда нарушается равновесие ингибирующих сигналов от иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (ИРК) и активирующих сигналов от рецепторов естественной цитотоксичности (РЕЦ). Таким образом, когда ИРК узнают достаточное число молекул HLA I на поверхности клетки-мишени, они подают в NK-клетки сигнал, способный ингибировать лизис. Напротив, если число таких молекул HLA недостаточно (случай опухолевых или инфицированных вирусом клеток), литический сигнал от РЕЦ не ингибируется, что приводит к лизису клетки-мишени (4).

У здоровых людей среди примерно 15% от общего числа лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих антиген NKH-1, более 95% клеток обладают как неспецифической, так и специфической цитотоксической активностью. Этот реагент позволяет характеризовать клеточные популяции или субпопуляции с NK и/или цитотоксической активностью, ассоциированной с фенотипом CD56+. Он также позволяет изучать эти популяции при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (2), аутоиммунные состояния, гиперчувствительность, вирусные инфекции и восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа (5). Наконец, он может быть полезен при фенотипировании злокачественных дискразий крови, таких как лейкемии и лимфомы (6,7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD56-PE+	50	17,47	6,09	35

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулярная масса сильно гликированного белка CD56 (молекулы NKH1) составляет 200–220 kDa (1,3). Он экспрессирует на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, которые демонстрируют не ограниченную главным комплексом гистосовместимости цитотоксичность (1,2). Моноклональное антитело N901 (NKH-1) вступает в реакцию с большинством NK-клеток (1,3). Оно также вступает в реакцию с небольшой популяцией CD3-положительных Т-клеток, которая опосредует пониженную цитотоксическую активность (2). Это антитело не вступает в реакцию с моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами. Антитело N901 (NKH-1) было отнесено к кластеру дифференцирования CD56 на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD56-PE +	12	21,4	1,4	6,5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E (CD56+))) и клетки отрицательной линии ((CD56–)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD56-PE	Y = 0,97 X + 0,22	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD56
Клон	N901 (NKH-1)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human chronic myeloid leukemia (hCML) cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD56-PC5

REF A07789 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD56, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Моноклональные антитела N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, который экспрессируется большинством натуральных киллеров (NK-клеток) периферической крови (1,2), а также субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3). NK-клетки характеризуются собственной и специфической цитотоксической активностью, которая проявляется, когда нарушается равновесие ингибирующих сигналов от иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (ИРК) и активирующих сигналов от рецепторов естественной цитотоксичности (РЕЦ). Таким образом, когда ИРК узнают достаточное число молекул HLA I на поверхности клетки-мишени, они подают в NK-клетки сигнал, способный ингибировать лизис. Напротив, если число таких молекул HLA недостаточно (случай опухолевых или инфицированных вирусом клеток), литический сигнал от РЕЦ не ингибируется, что приводит к лизису клетки-мишени (4).

У здоровых людей среди примерно 15% от общего числа лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих антиген NKH-1, более 95% клеток обладают как неспецифической, так и специфической цитотоксической активностью. Этот реагент позволяет характеризовать клеточные популяции или субпопуляции с NK и/или цитотоксической активностью, ассоциированной с фенотипом CD56+. Он также позволяет изучать эти популяции при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (2), аутоиммунные состояния, гиперчувствительность, вирусные инфекции и восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа (5). Наконец, он может быть полезен при фенотипировании злокачественных дискразий крови, таких как лейкемии и лимфомы (6,7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD56-PC5+	50	16,2	7,4	45,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулярная масса сильно гликированного белка CD56 (молекулы NKH1) составляет 200–220 kDa (1,3). Он экспрессирует на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, которые демонстрируют не ограниченную главным комплексом гистосовместимости цитотоксичность (1,2). Моноклональное антитело N901 (NKH-1) вступает в реакцию с большинством NK-клеток (1,3). Оно также вступает в реакцию с небольшой популяцией CD3-положительных Т-клеток, которая опосредует пониженную цитотоксическую активность (2). Это антитело не вступает в реакцию с моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами. Антитело N901 (NKH-1) было отнесено к кластеру дифференцирования CD56 на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD56-PC5 +	12	17,3	0,7	4,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E (CD56+))) и клетки отрицательной линии ((CD56–)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD56-PC5	Y = 0,89 X + 1,01	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD62P
Клон	CLB-Thromb/6
Гибридома	SP2/0 x (balb/c x A/J)
Иммуноген	Human platelets
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 3,0 - 5,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD62P-FITC

REF A07790 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD62P, 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 тромбоцитами.

Специфическая окраска тромбоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest. Затем тромбоциты анализируют методами 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.

Гейтинг популяций тромбоцитов осуществляется с помощью конъюгированного антитела CD41-ФЭ (Ref. A07781).

Флуоресценция ограниченных таким образом тромбоцитов 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ реакционной способности тромбоцитов (гипо- и гиперреактивность) (1,2,3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Для исследований активации ex vivo венозная кровь должна собираться в пластиковые или силиконизированные стеклянные пробирки с ЭДТА.

В конкретном случае активации тромбоцитов не рекомендуется использовать ЭДТА или гепарин (4).

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые или силиконированные пробирки для гемолиза.
- Реагент для гейтинга: IOTest CD41-PE (каталожный номер A07781).
- Мышь Изотипический контроль FITC: Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Отмывочный буфер для исследований ex vivo (PBS: 0.01 M фосфат натрия; 0.145 M хлорид натрия; pH 7.2, бычий сывороточный альбумин 1 мг/мл.
- Отмывочный буфер для исследований после активации in vitro: Tyrode's buffer (138 мМ NaCl, 3,6 мМ KCl, 10 мМ NaHCO3, 0,4 мМ NaH2PO4, 10 мМ MgCl2, и 6 мМ глюкозы, доведенный до pH 7.3 фосфорной кислотой) (5).
- Для исследований активации in vitro: агонист(ы) тромбоцитов в растворе (например, 50 µM ADP, 100 µM TRAP-6).
- Водяная баня 37°C.
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Для анализа тромбоцитов, экспрессирующих CD62P, можно использовать цельную кровь, обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) или суспензию отмытых тромбоцитов. Преимуществом процедуры для цельной крови, описанной ниже, является возможность проведения как анализа реактивности тромбоцитов ex vivo, так и активации тромбоцитов in vitro (3).

ПРИМЕЧАНИЕ:Для каждого анализируемого образца дополнительно к тестовой пробирке необходима контрольная пробирка, в которой клетки смешиваются с изотипическим контролем IgG1-FITC (Ref. A07795).

1. Оставьте PBS-BSA и растворы агонистов при 37°C
2. Используйте PBS-BSA хранимые при 4°C.
3. Разбавьте образец крове немедленно после получения PBS-BSA буфером при 37°C до концентрации 20.000 тромбоцитов/мкл.
4. Исследование ex vivo:

Вносят 40 мкл разведенного образца, 20 мкл CD41-PE (Ref. A07781) и 20 мкл CD62P-FITC (Ref. A07790) в каждую пробирку. Необходимо предусмотреть дополнительную пробирку для изотипического контроля IgG1-FITC (Ref. A07795).

Осторожно перемешайте и инкубируйте 5 минут при 37°C в защищенном от света месте.

Остановите реакцию (смотрите шаг 6).

5. Активация In vitro:

Поместите 72 мкл разведенного образца в каждую пробирку.

Добавьте 8 мкл раствора агониста.

Осторожно встряхните и инкубируйте 10 минут при 37°C.

Добавляют 20 мкл CD41-PE (Ref. A07781) и 10 мкл CD62P-FITC (Ref. A07790). Необходимо предусмотреть дополнительную пробирку для изотипического контроля IgG1-FITC (Ref. A07795).

Остановите реакцию (смотрите шаг 6).

6. Остановите реакцию добавлением 2 мл PBS-BSA буфера при 4°C.
7. Выполните сбор данных в течение 2 часов, с учетом следующих рекомендаций:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Логарифмическое усиление, низкая скорость тока; накопление не менее 5000 событий; исследуемая область (целевая популяция) задается представлением CD41-положительных событий (FL2 versus FS), исключаются обломки клеток (SS versus FS), строятся гистограммы число событий versus FL2 (все тромбоциты) и число событий versus FL1 (все активированные тромбоциты), после чего вычисляется процентное содержание положительных тромбоцитов.

ПРИМЕЧАНИЕ: анализ препарата необходимо выполнить в течение 24 часов.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 15 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD62P-FITC+	15	14,1	10,7	76,1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (mAb) CLB-Thromb/6 распознает регион, расположенный между лектиновым и EGF-подобным доменами (7,8,9). Моноклональное антитело (mAb) CLB-Thromb/6 было отнесено к CD62P во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Vienna, Austria, в 1989 г. (код WS: 74, раздел P) (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений содержания положительно окрашенных клеток в образце (суспензия тромбоцитов, активированных тромбином). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD62P-FITC+	12	73,44	3,75	5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, суспензию положительных (активированных тромбином) и суспензию отрицательных (покоящихся) тромбоцитов 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD62P-FITC	Y = 1,0263 X - 1,3973	0,9984

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. 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.
4. Во избежание высокового фонового сигнала (шума) не проводите фиксацию клеток в присутствии несвязанных антител.
5. Длительное хранение, центрифугирование, условия забора венозной крови, отличные от описаных в инструкции увеличивают неспецифическую активацию тромбоцитов.
6. Не используйте АДФ в качестве агониста для отмытых тромбоцитов, поскольку в этом случае дегрануляция, необходимая для экспрессии CD62P на поверхности тромбоцитов, не индуцируется.
7. Избегайте фиксации тромбоцитов до окрашивания, поскольку это приводит к артефактам экспрессии CD62P (11).
8. В контексте исследования функции и активации тромбоцитов, преаналитическая процедура может оказать значительное влияние на результаты и увеличить искусственным образом активацию тромбоцитов (12,13) . Например, даже если SZ21 распознает экспрессию антигена CD61 на пробах возрастом до 24 часов, в литературе рекомендуется выполнить анализ пробы в течение нескольких часов (13).
9. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (14).
10. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (15).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	FMC7
Клон	FMC7
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human B lymphoblastoid cell line, HRIK
Иммуноглобулин	IgM
Вид	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 13 - 23
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-FMC7-FITC

REF A07791 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген FMC7, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ распознанного антигена mAb FMC7 полезен для определения характеристик, подсчета и мониторинга популяций B-лимфоцитов (от FMC7+ до FMC7–) при злокачественной лимфоидной дискразии крови (напр., FMC7– для плазмоцитарной лейкемии, хронического B-клеточного лимфолейкоза (B-CLL) и FMC7+ для волосковоклеточного лейкоза, пролимфоцитарного лейкоза или неходжкинской лимфомы B-клеточного пути (B-клеточная NHL) (1,2,3,4,5,6,7).

FMC-7 используется в качестве стандартного маркера в системе оценки Matutes для дифференциации B-CLL и B-клеточного лейкоза другого типа (1,2,3,4,5,6,7); замещение FMC7 на CD20 приводит к снижению точности с 94,4% до 81,5%. Экспрессия FMC7 оказалась одним из наиболее надежных маркеров для различения B-CLL и других B-клеточных неоплазий. В B-клеточной NHL экспрессия CD20 коррелирует с FMC7, а также с другими B-клеточными маркерами (напр., CD22 и CD79b). Исследования продемонстрировали корреляцию между более низкой общей выживаемостью (OB) при диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфоме (DLBCL) и ее экспрессией FMC7– и CD20+ (8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль IgM(mouse)-FITC.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
FMC7-FITC+	50	11,3	5,06	45

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген, распознанный моноклональным антителом (mAb) FMC7, представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярным весом 105 кДа (10,11). Антиген FMC7 был описан как частная конформация поверхностного белка, кодированного геном CD20 (12,13,14). Способность mAb FMC7 вступать в реакцию со своим частным эпитопом CD20 зависит от уровня холестерина в составе мембраны (13). В циркулирующих клетках крови mAb FMC7 распознает субпопуляцию B-лимфоцитов. Экспрессирование молекулы, распознанной FMC7, не обнаружено на T-лимфоцитах, NK-клетках, полиморфно-ядерных гранулоцитах, тромбоцитах или эритроцитах (15).

Субпопуляция B-лимфоцитов, распознанная антителом FMC7, экспрессирует поверхностные иммуноглобулины (9,(10,11; 15,16,17), определяя таким образом этап созревания B-лимфоцитов, не совпадающих с FMC7– B-лимфоцитами (15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты FMC7-FITC +	12	22,2	1,17	5,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (circulating B lymphocytes) и клетки отрицательной линии (DAUDI and NAMALWA) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
FMC7-FITC	Y = 0,934 X +2,74	0,9961

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD235a
Клон	11E4B-7-6 (KC16)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human red blood cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD235a-PE

REF A07792 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD235a, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Гликофорин А представляет собой сиалогликопротеин, который экспрессируется на поверхности эритробластных клеток предшественников (начиная со стадии про-эритробласта) ретикулоцитов и зрелых эритроцитов (1–3). Антитела к гликофорину позволяют произвести идентификацию и подсчет клеток эритроцитарной линии.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

При окрашивании реагентом нелизированной крови здоровых доноров (чтобы сделать возможным окрашивание эритроцитов) отмечается 100% положительное окрашивание клеток по гликофорину A. После лизирования эритроцитов не наблюдается положительного окрашивания ни лимфоцитов, ни моноцитов, ни гранулоцитов. В этих условиях определение референсных интервалов затруднено.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональные антитела 11E4B 7 6 (KC16) взаимодействуют с 27 39 аминокислотной последовательностью N концевого участка гликофорина A и не распознают гликофорин B (3).

На седьмой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (7th HLDA), проходившей в Хэррогите, Англия, в 2000 г., было подтверждено, что данные моноклональные антитела направлены против CD235a (WS Code : 70359, Section : Red Cells) (4).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HEL Line	12	26,5	0,7	2,5

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ( ) и клетки отрицательной линии () 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD235a-PE	Y = 0,97 X + 0,81	0,997

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	HLA-DR
Клон	Immu357
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	EBV-transformed cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-HLA-DR-PC5

REF A07793 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген HLA-DR, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула HLA-DR представляет собой полезный индикатор для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании в рамках расширенной панели иммунофенотипирования. Анализ экспрессии антигена HLA-DR позволяет определить бластные клетки миелоидного происхождения. Их часто наблюдаемый фенотип: HLA-DR+ CD7– CD45 слабый. Однако гипергранулярные лейкозы промиелоцитарного типа (подгруппа LAM-M3) характеризуются слабой экспрессией индикатора HLA-DR или ее полным отсутствием (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR-PC5+	20	18,29	4,73	25,9

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело Immu357 распознает эпитоп, который переносится на мономорфном белке в 29 – 33 kDa, идентифицируемый как HLA-DR. Система HLA (антиген лейкоцитов человека) – название главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Зашифрованные 5 локусами (DM, DO, DP, DQ и DR) локуса D молекулы HLA класса II также называют антигенами HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (2,3). Экспрессия антигенов класса II ограничена антиген-презентирующими клетками, то есть B-лимфоцитами, моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса кожи (3,4). На тимоцитах антиген HLA-DR экспрессируется только после активации (5). Стволовые клетки и кроветворные клетки-предшественники экспрессируют его до определенной стадии своей дифференциации (3,6).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты HLA-DR-PC5 +	12	18,89	0,39	2,1

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((DAUDI)) и клетки отрицательной линии ((HPBALL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
HLA-DR-PC5	Y = 1,004 X + 1,685	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (7).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (8).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации компонента 1	Спецификации компонента 2
Специфичность	Not applicable	Not applicable
Клон	679.1Mc7	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1	IgG1
Вид	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	FITC / Ig: 2,5 - 5,0	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	

IOTest
Conjugated Antibodies
IgG1(mouse)-FITC
IgG1(mouse)-PE

REF A07794

50 тестов; 1 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная смесь мышиных изотипических контролей IgG1-FITC / IgG1-PE из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Реактив позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов с помощью комбинаций специфических антител изотипа IgG1, конъюгированных с ФИТЦ или ФЭ, из серии IOTest.

ПРИНЦИП

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

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.

Гистограмма FS versus SS позволяет исключать из рассмотрения фрагменты разрушенных клеток, а также отличать лимфоциты от моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов. Окно накопления сигнала, ограничивающее целевую популяцию, используется для создания монопараметрической гистограммы, которая соотносит число событий с флуоресценцией выделенных таким образом клеток или тромбоцитов. Такой анализ позволяет отличить положительно окрашенные события от событий, рассматривающихся как неокрашенные. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи электронного окна.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Данная смесь изотипических контролей из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) и R-фикоэритрином (ФЭ), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ GHS

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 90 дней.

ПРОБЫ

Исследование одинаково легко проводится на цельной крови и клетках, выделенных в градиенте плотности. Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлических трубах водопровода. См. NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76) (Бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH)) «Взрывоопасные азиды (8/16/76)».
Чтобы избежать накопления азидных соединений, промывайте сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфическая комбинация антител, конъюгированных с ФИТЦ и ФЭ, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данная смесь изотипических контролей, IgG1-FITC / IgG1-PE (Ref. A07794) адаптирована для использования с соответствующими комбинациями ФИТЦ- и ФЭ-конъюгированных антител серии IOTest.

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реактивом, описанным выше, был обработан образец крови здорового взрослого человека. Результаты 12 выполненных в течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра измерений средней интенсивностии флуоресценции (СИФ) IgG1-ФИТЦ-отрицательных (неокрашенных) событий проанализированы в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	0,17	0,002	1,0
Моноциты IgG1 -	12	0,69	0,010	1,5
Гранулоциты IgG1 -	12	0,83	0,013	1,6

Результаты 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) IgG1-ФЭ-отрицательных (неокрашенных) событий проанализированы в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	0,15	0,001	0,7
Моноциты IgG1 -	12	0,30	0,007	2,2
Гранулоциты IgG1 -	12	0,46	0,005	1,0

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 2,5-5,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-FITC

REF A07795 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-FITC , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с FITC , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии IOTest служит для оценки уровня неспецифического окрашивания образца моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) из серии IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с FITC , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -FITC (Ref. A07795) адаптирован для использования с FITC -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Цельная кровь одного здорового взрослого человека была обработана с использованием описанного выше реагента. Полученные в один днем и на одном цитометре результаты, включающие в себя 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (MFI) отрицательных событий, проанализированы в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	0,140	0,00	1,3
Моноциты IgG1 -	12	0,610	0,02	3,0
Гранулоциты IgG1 -	12	0,860	0,01	1,4

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-PE

REF A07796 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-PE , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с PE , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с R-фикоэритрин (PE), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с PE , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -PE (Ref. A07796) адаптирован для использования с PE -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Цельная кровь одного здорового взрослого человека была обработана с использованием описанного выше реагента. Полученные в один днем и на одном цитометре результаты, включающие в себя 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (MFI) отрицательных событий, проанализированы в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	0,140	0,00	1,3
Моноциты IgG1 -	12	0,610	0,02	3,0
Гранулоциты IgG1 -	12	0,860	0,01	1,4

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-ECD

REF A07797 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-ECD , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с ECD , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Этот изотипический контроль диапазона IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональных антител одного изотипа, конъюгированных с красителем R Фикоэритрин-Texas Red-X (ECD) и принадлежащих к диапазону IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с ECD , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -ECD (Ref. A07797) адаптирован для использования с ECD -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цельная кровь одного здорового взрослого человека была обработана с использованием описанного выше реагента. Полученные в один днем и на одном цитометре результаты, включающие в себя 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (MFI) отрицательных событий, проанализированы в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	0,12	0,002	1,3
Моноциты IgG1 -	12	0,51	0,024	4,7
Гранулоциты IgG1 -	12	0,69	0,017	2,5

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-PC5

REF A07798 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-PC5 , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с PC5 , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с R-фикоэритрин-цианином 5 (PC5), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с PC5 , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -PC5 (Ref. A07798) адаптирован для использования с PC5 -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цельная кровь одного здорового взрослого человека была обработана с использованием описанного выше реагента. Полученные в один днем и на одном цитометре результаты, включающие в себя 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (MFI) отрицательных событий, проанализированы в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	0,17	0,005	2,7
Моноциты IgG1 -	12	0,67	0,044	6,6
Гранулоциты IgG1 -	12	0,45	0,011	2,5

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Спецификации	
Лизирующий раствор IOTest 3 Lysing Solution, 10X концентрат	
Форма выпуска	Жидкость
Активный ингредиент	NH4Cl
Объем	20 мл
Число флаконов	1 флакон
Объем на одно определение	2 мл рабочего раствора (маточный раствор, разведенный до 1/10e)

Лизирующий раствор

IOTest 3
10X концентрат

REF A07799 100 определений; 20 мл

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Лизирующий раствор IOTest 3 Lysing Solution предназначен для лизиса эритроцитов – процедуры, которая часто используется в приготовлении биологических образцов (в частности, цельной периферической крови человека) для анализа методом проточной цитометрии после окрашивания плазматической мембраны лейкоцитов флуоресцирующими антителами (1,2).

ПРИНЦИП

Иммунофенотипирование лейкоцитов с помощью проточной цитометрии как правило требует предварительного удаления эритроцитов. Этого можно добиться двумя способами: путем лизиса эритроцитов или выделения мононуклеарных клеток с помощью градиента плотности (3).

Процедуры лизиса осуществляются быстрее, чем выделение в градиенте плотности, и обычно вызывают лишь умеренные нарушения морфологии и антигенных характеристик лейкоцитов. Растворы на основе аммония хлорида, который является активным ингредиентом лизирующего раствора IOTest 3 Lysing Solution, используются для лизиса эритроцитов в течение многих лет (4).

Образцы необходимо хранить при температуре 2–8°C и быстро анализировать с помощью проточной цитометрии. Если анализ откладывается на несколько часов, препараты можно зафиксировать ФСБ, содержащим 0,8% формальдегида (например, можно использовать фиксирующий раствор IOTest 3 Fixative Solution – Ref.A07800 – в рабочем разведении 1X). В таких случаях необходимо на этапе фиксации предварительно отмыть клетки с применением больших объемов жидкости.

Проточный цитометр измеряет рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет локализовать клетки 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.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
4. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
5. 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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

Концентрат (10X) фиксирующего раствора IOTest 3 следует хранить при 2–8°C. В невскрытом флаконе реактив сохраняет стабильность до даты истечения срока годности, указанной на флаконе. Не замораживайте.

После вскрытия флакона реактив сохраняет стабильность в течение 90 дней.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рабочий раствор (1X) необходимо готовить ежедневно, а остаток следует удалять в отходы по окончании рабочего дня.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль ЭДТА, цитрат-декстрозу или гепарин).

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 500 мкл, 1 мл и 2 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Конъюгаты специфических антител.
- Отрицательные контроли.
- Буфер (ФСБ: 0,01M фосфат натрия; 0,145M хлорид натрия; pH 7,2).
- Градуированные тест-пробирки.
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА

Рабочее разведение (1X) лизирующего раствора IOTest 3 Lysing Solution необходимо готовить ежедневно.

Для этого добавляют 9 объемов деионизированной воды к одному объему маточного раствора (10X). Не замораживать.

Избыток рабочего раствора (1X) следует удалять в отходы в конце рабочего дня.

ПРОЦЕДУРА

Предварительная подготовка образца

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть менее 10^4 клеток/мкл (10^{10}/л). При необходимости образец разводят ФСБ, доводя концентрацию лейкоцитов до 5x 10^3 клеток/мкл (5 x 10^9/л).

Методика

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с отрицательным контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В каждую тест-пробирку добавляют необходимое количество конъюгата специфического антитела, а в каждую контрольную пробирку – необходимое количество отрицательного 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. Добавляют 2 мл лизирующего раствора IOTest 3 Lysing Solution в его рабочем разведении (1X) . Немедленно встряхивают на приборе Vortex, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.

   ВНИМАНИЕ: Замечено, что при использовании данной процедуры с этапом отмывки могут образовываться дублеты клеток (называемые беглецами), что может приводить к получению ошибочных результатов из-за изменения светорассеивающих свойств дублетов и их выхода за пределы областей гейтинга (5). Распада дублетов можно добиться тщательным встряхиванием на приборе Vortex.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

- 0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,8% формальдегида или, например, в фиксирующем растворе IOTest 3 (REF. A07800) в его рабочей концентрации (1X), если препараты будут храниться менее 24 часов.
- 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12измерений процентного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов относительно всех накопленных событий – лейкоцитов и обломков клеток на гистограмме, соотносящей два вида рассеивания света, т.е. FS *versus* SS, – в образце крови одного донора.

С другой стороны, было проанализировано 12измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) моноцитов после окраски реактивом IOTest 3 reagent CD14-FITC/CD13-PE/CD45-ECD (Ref. A07722) с целью оценки воспроизводимости значений интенсивности флуоресценции. Накопление данных и анализ проводились с помощью проточного цитометра COULTER EPICS XL, снабженного программным обеспечением System II.

Полученные результаты обобщены в следующих таблицах:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты (FS *vs* SS)	12	22,9	0,4	1,9
Моноциты (FS *vs* SS)	12	7,5	0,3	3,6
Гранулоциты (FS *vs* SS)	12	51,6	0,7	1,3

Флуоресценция / Целевые клетки	Номер	Средняя величина (СИФ)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
ФИТЦ / $CD14^+$ Моноциты	12	35,4	0,5	1,5
ФЭ / $CD13^+$ Моноциты	12	9,9	0,2	2,3
ECD / $CD45^+$ Моноциты	12	54,6	1,3	2,4

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. В случае лейкоцитоза образец следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5 x 10^9 лейкоцитов в 1 л (6).
4. 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).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
	Фиксирующий раствор IOTest 3, 10X концентрат
Форма выпуска	Жидкость
Активный ингредиент	Формальдегид
Объем	10 мл
Число флаконов	1 флакон
Объем на одно определение	от 0,5 до 1 мл рабочего раствора (разведенного в соответствии с инструкциями, приведенными ниже)

Фиксирующий раствор

IOTest 3
10X концентрат

REF A07800 100 определений; 10 мл

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Фиксация – этап обработки лейкоцитов, позволяющий получить препарат, который сохраняется в течение нескольких часов после окрашивания флуоресцирующим антителом без изменения свойств (1,2,3).

Фиксирующий раствор IOTest 3 Fixative Solution, основу которого составляет формальдегид, разработан специально для фиксации лейкоцитов. Он может применяться для обработки препаратов лейкоцитов независимо от того, проводилась ли процедура лизиса эритроцитов, как до окрашивания, так и после него.

Классическое использование предполагает, что для фиксации препараты отмывают с помощью центрифугирования, после чего осадок клеток ресуспендируют в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution, который вначале разводят ФСБ до рабочей концентрации.

ПРИНЦИП

Окрашенные образцы для проточной цитометрии следует хранить при 2 - 8°C и быстро исследовать в цитометре. Если анализ задерживается на несколько часов, рекомендуется фиксировать препараты ФСБ, содержащим формальдегид. Последний присутствует в фиксирующем растворе IOTest 3 Fixative Solution, поэтому обработка клеток стабилизирует клеточные белки за счет ковалентной сшивки свободных аминогрупп. В таких случаях необходимо перед фиксацией отмыть клетки с применением больших объемов жидкости.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Формальдегид токсичен и вызывает аллергические реакции. Возможно, формальдегид является канцерогеном. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки, глаза и одежду.
4. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
5. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
6. 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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Fixative Solution (10 X)

ОПАСНО!

H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
H313	Может нанести вред при контакте с кожей
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H335	Может вызывать раздражение дыхательных путей.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
	Формальдегид 5 - 10%

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

Концентрат (10X) фиксирующего раствора IOTest 3 следует хранить при 2 – 8°C. В невскрытом флаконе реактив сохраняет стабильность до даты истечения срока годности, указанной на флаконе. Не замораживайте.

После вскрытия флакона реактив сохраняет стабильность в течение 90 дней.

Рабочие разведения можно использовать в течение дня.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль ЭДТА, цитрат-декстрозу или гепарин).

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 24часов после венепункции.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20 мкл, 500 мкл и 1 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Градуированные тест-пробирки.
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА

Концентрат (10X) фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution содержит 8% формальдегида.

Мы рекомендуем использовать лизирующий раствор IOTest 3 Lysing Solution (Ref. A07799) и антитела IOTest 3 в сочетании с 0,8% рабочим раствором (1X) формальдегида. Он готовится путем добавления 9 объемов ФСБ к одному объему маточного раствора формальдегида (10X).

Лизирующий раствор VersaLyse Lysing Solution (Ref. A09777) и антитела IOTest мы рекомендуеум использовать в сочетании с 0,1% рабочим раствором формальдегида. Он готовится путем добавления 1 мл ФСБ к 12,5 мкл маточного раствора формальдегида (10X).

Приготовьте нужное количество рабочего раствора исходя из объема, расходуемого на одну пробирку, который может составлять 0,5 или 1 мл.

Независимо от конечной концентрации формальдегида, рабочий раствор не следует хранить в холодильнике и сохраняет стабильность в течение 24 часов.

Более того, можно смешать лизирующий раствор VersaLyse Lysing Solution (Ref. A09777) и фиксирующий раствор IOTest 3 Fixative Solution для получения смеси “Fix-and-Lyse”; ее использование позволяет одновременно лизировать эритроциты и фиксировать лейкоциты.

Более подробно информация об этом варианте использования фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution изложена в спецификации лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (Ref. A09777).

ПРОЦЕДУРА

Следуйте процедуре фиксации, описанной для используемого антитела.

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ

Фиксированные препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов относительно всех накопленных событий – лейкоцитов и обломков клеток на гистограмме, соотносящей два вида рассеяния света т.е. FS *versus* SS, – в образце крови одного донора после обработки лизирующим и фиксирующим растворами IOTest

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Накопление данных проводили с помощью проточного цитометра COULTER EPICS XL после фиксации в течение 6 часов. Для анализа использовали программное обеспечение System II.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты (FS *vs* SS)	12	32,3	1,7	5
Моноциты (FS *vs* SS)	12	2,7	0,5	17
Гранулоциты (FS *vs* SS)	12	20,8	1,1	5

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение одного и того же дня силами двух лаборантов было выполнено 12 измерений процентного содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов относительно всех накопленных событий – лейкоцитов и обломков клеток на гистограмме FS *versus* SS – в образце крови одного донора после обработки лизирующим и фиксирующим растворами IOTest 3. Накопление данных проводили с помощью проточного цитометра COULTER EPICS XL после фиксации в течение 6 часов. Для анализа использовали программное обеспечение System II.

Полученные результаты обобщены в следующих таблицах:

Цитометр №1:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты (FS *vs* SS)	12	32,3	1,7	5
Моноциты (FS *vs* SS)	12	2,7	0,5	17
Гранулоциты (FS *vs* SS)	12	20,8	1,1	5

Цитометр №2:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты (FS *vs* SS)	12	30,4	1,4	5
Моноциты (FS *vs* SS)	12	3,2	0,4	13
Гранулоциты (FS *vs* SS)	12	23,5	1,0	4

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. В случае лейкоцитоза образец следует разводить ФСБ приблизительно до концентрации 5 x 10^9 лейкоцитов в 1 л (4).
4. 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 (5).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Реагент 1	Реагент 2
	Фиксирующее вещество	Пермеабилизующее вещество
Форма выпуска	Жидкость	Жидкость
Активный ингредиент	Формальдегид	Сапонин
Объем	5 мл	5 мл
Число флаконов	1 флакон	1 флакон
Объем на одно определение	100 мкл	100 мкл

IntraPrep

Реактив для пермеабилизации лейкоцитов

REF A07802 50 определений; 2 x 5 мл, 2 x 0,1 мл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

IntraPrep состоит из двух готовых к употреблению реактивов, которые увеличивают проницаемость плазматической мембраны лейкоцитов, что позволяет определять внутриклеточные антигенные детерминанты с помощью флуоресцирующих моноклональных антител. IntraPrep используют для приготовления биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии. Реактив оптимизирован для минимизации неспецифического окрашивания при исследовании данного типа (1,2,3,4).

ПРИНЦИП

На первом этапе клетки фиксируют реактивом 1. После отмывания лейкоциты пермеабилизуют реактивом 2; при этом происходит лизис эритроцитов. На следующем этапе клетки подвергают воздействию конъюгированных моноклональных антител, специфичных к внутриклеточным антигенным детерминантам. Затем лейкоциты анализируют методами проточной цитометрии.

Тем не менее, возможность визуализации поверхностных антигенных детерминант сохраняется. В этом случае конъюгаты специфических моноклональных антител инкубируют с клетками до фиксации.

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.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
4. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
5. Реактив 1 содержит формальдегид. Формальдегид токсичен и вызывает аллергические реакции. Возможно, формальдегид является канцерогеном. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки, глаза и одежду.
6. Реактив 2 содержит азид натрия (NaN_3). Он требует осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза. Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Реагент 1: Фиксация — ОПАСНО!

H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
H313	Может нанести вред при контакте с кожей
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
H370	Наносит вред органам.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.
	Метанол 1 - 2%
	Формальдегид 5 - 10%

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

IntraPrep следует хранить при 18 – 25°C.

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

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

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль EDTA или цитрат-декстрозу, или гепарин).

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 24часов после венепункции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 10, 20, 50, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Специфические моноклональные антитела (мАт).
- Изотипические контроли.
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

A - Внутрицитоплазматическое окрашивание

Число эритроцитов в образце не должно превышать 6 x 10^6/мкл (6 x 10^{12}/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать 5 x10^3/мкл (5 x 10^9/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 50 мкл исследуемого образца.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 1. Сразу после каждого добавления пробирки энергично встряхивают на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 2. ВСТРЯХИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ VORTEX НЕ СЛЕДУЕТ; реактив 2 должен естественным образом диффундировать внутрь осадка клеток.
8. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре (18 – 25°C), НЕ ВСТРЯХИВАЯ.
9. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
10. В тест-пробирку вносят 20 мкл мАт (специфичного к внутрицитоплазматической антигенной детерминанте).
11. В каждую контрольную пробирку вносят 20 мкл изотипического контроля.
12. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
13. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
14. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
15. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
16. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Б - Окрашивание внутрицитоплазматических и мембранных детерминант

Число эритроцитов в образце не должно превышать 6 x 10^6/мкл (6 x 10^{12}/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать 5 x10^3/мкл (5 x 10^9/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В тест-пробирку и в контрольную пробирку вносят по 50 мкл исследуемого образца.
2. В тест-пробирку вносят 20 мкл (или 10 мкл : необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения) мАт (специфичного к мембранной антигенной детерминанте).
3. В каждую контрольную пробирку вносят по 20 мкл (или 10 мкл : необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения) изотипического контроля.
4. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
5. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
6. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 1. Сразу после каждого добавления пробирки энергично встряхивают на приборе Vortex.
7. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
8. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
9. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
10. Удаляют супернатант аспирацией.
11. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 2. ВСТРЯХИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ VORTEX НЕ СЛЕДУЕТ; реактив 2 должен естественным образом диффундировать внутрь осадка клеток.
12. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре (18 – 25°C), НЕ ВСТРЯХИВАЯ.
13. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
14. В тест-пробирку вносят 20 мкл мАт (специфичного к внутрицитоплазматической антигенной детерминанте).
15. В каждую контрольную пробирку вносят по 20 мкл изотипического контроля.
16. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
17. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
18. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
19. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
20. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания гранулоцитов относительно всех лейкоцитов в крови одного донора. Таким образом идентифицируют гранулоциты с одной стороны по светорассеянию (FS versus SS), а с другой стороны по экспрессии миелопероксидазы (МПО). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Гранулоциты (FS *vs* SS)	12	52,4	1,38	2,6
Гранулоциты (МПО)	12	55,6	1,6	2,9

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Некоторые антигенные детерминанты могут быть чувствительны к формальдегиду или сапонину. Каждой лаборатории необходимо контролировать условия использования моноклональных антител.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Данный реактив оптимизирован таким образом, чтобы обеспечить наилучшее отношение специфического сигнала к неспецифическому. Поэтому важно, чтобы соотношение объема реактива и числа лейкоцитов при каждом определении было одним и тем же.
5. В случае цитоза образец следует разводить ФСБ таким образом, чтобы концентрация лейкоцитов стала меньше 5×10^9/л, а концентрация эритроцитов меньше 6×10^{12}/л (5).
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 (6).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Реагент 1	Реагент 2
	Фиксирующее вещество	Пермеабилизующее вещество
Форма выпуска	Жидкость	Жидкость
Активный ингредиент	Формальдегид	Сапонин
Объем	5 мл	5 мл
Число флаконов	3 флакона	3 флакона
Объем на одно определение	100 мкл	100 мкл

IntraPrep

Реактив для пермеабилизации лейкоцитов

REF A07803 150 определений; 6 x 5 мл
2 x 0,1 мл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

IntraPrep состоит из двух готовых к употреблению реактивов, которые увеличивают проницаемость плазматической мембраны лейкоцитов, что позволяет определять внутриклеточные антигенные детерминанты с помощью флуоресцирующих моноклональных антител. IntraPrep используют для приготовления биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии. Реактив оптимизирован для минимизации неспецифического окрашивания при исследовании данного типа (1,2,3,4).

ПРИНЦИП

На первом этапе клетки фиксируют реактивом 1. После отмывания лейкоциты пермеабилизуют реактивом 2; при этом происходит лизис эритроцитов. На следующем этапе клетки подвергают воздействию конъюгированных моноклональных антител, специфичных к внутриклеточным антигенным детерминантам. Затем лейкоциты анализируют методами проточной цитометрии.

Тем не менее, возможность визуализации поверхностных антигенных детерминант сохраняется. В этом случае конъюгаты специфических моноклональных антител инкубируют с клетками до фиксации.

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.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
4. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
5. Реактив 1 содержит формальдегид. Формальдегид токсичен и вызывает аллергические реакции. Возможно, формальдегид является канцерогеном. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки, глаза и одежду.
6. Реактив 2 содержит азид натрия (NaN_3). Он требует осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза. Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Реагент 1: Фиксация — ОПАСНО!

H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
H313	Может нанести вред при контакте с кожей
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
H370	Наносит вред органам.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.
	Метанол 1 - 2%
	Формальдегид 5 - 10%

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

IntraPrep следует хранить при 18 – 25°C.

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

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

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль EDTA или цитрат-декстрозу, или гепарин).

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 24часов после венепункции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 10, 20, 50, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Специфические моноклональные антитела (мАт).
- Изотипические контроли.
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

A - Внутрицитоплазматическое окрашивание

Число эритроцитов в образце не должно превышать 6 x 10^6/мкл (6 x 10^{12}/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать 5 x10^3/мкл (5 x 10^9/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 50 мкл исследуемого образца.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 1. Сразу после каждого добавления пробирки энергично встряхивают на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 2. ВСТРЯХИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ VORTEX НЕ СЛЕДУЕТ; реактив 2 должен естественным образом диффундировать внутрь осадка клеток.
8. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре (18 – 25°C), НЕ ВСТРЯХИВАЯ.
9. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
10. В тест-пробирку вносят 20 мкл мАт (специфичного к внутрицитоплазматической антигенной детерминанте).
11. В каждую контрольную пробирку вносят 20 мкл изотипического контроля.
12. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
13. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
14. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
15. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
16. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Б - Окрашивание внутрицитоплазматических и мембранных детерминант

Число эритроцитов в образце не должно превышать 6 x 10^6/мкл (6 x 10^{12}/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать 5 x10^3/мкл (5 x 10^9/л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В тест-пробирку и в контрольную пробирку вносят по 50 мкл исследуемого образца.
2. В тест-пробирку вносят 20 мкл (или 10 мкл : необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения) мАт (специфичного к мембранной антигенной детерминанте).
3. В каждую контрольную пробирку вносят по 20 мкл (или 10 мкл : необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения) изотипического контроля.
4. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
5. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
6. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 1. Сразу после каждого добавления пробирки энергично встряхивают на приборе Vortex.
7. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
8. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
9. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
10. Удаляют супернатант аспирацией.
11. В тест-пробирку и контрольную пробирку добавляют по 100 мкл реактива 2. ВСТРЯХИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ VORTEX НЕ СЛЕДУЕТ; реактив 2 должен естественным образом диффундировать внутрь осадка клеток.
12. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре (18 – 25°C), НЕ ВСТРЯХИВАЯ.
13. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
14. В тест-пробирку вносят 20 мкл мАт (специфичного к внутрицитоплазматической антигенной детерминанте).
15. В каждую контрольную пробирку вносят по 20 мкл изотипического контроля.
16. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
17. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
18. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
19. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
20. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания гранулоцитов относительно всех лейкоцитов в крови одного донора. Таким образом идентифицируют гранулоциты с одной стороны по светорассеянию (FS versus SS), а с другой стороны по экспрессии миелопероксидазы (МПО). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Гранулоциты (FS *vs* SS)	12	52,4	1,38	2,6
Гранулоциты (МПО)	12	55,6	1,6	2,9

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Некоторые антигенные детерминанты могут быть чувствительны к формальдегиду или сапонину. Каждой лаборатории необходимо контролировать условия использования моноклональных антител.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Данный реактив оптимизирован таким образом, чтобы обеспечить наилучшее отношение специфического сигнала к неспецифическому. Поэтому важно, чтобы соотношение объема реактива и числа лейкоцитов при каждом определении было одним и тем же.
5. В случае цитоза образец следует разводить ФСБ таким образом, чтобы концентрация лейкоцитов стала меньше 5 x 10^9/л, а концентрация эритроцитов меньше 6 x 10^{12}/л (5).
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 (6).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD5
Клон	BL1a
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from human thoracic duct
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4,0-6,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD5-FITC

REF A08932 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD5, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD5 является многофункциональным рецептором, экспрессируемым в сочетании с антиген-специфическими рецепторами на лимфоциты T и B-1a. CD5 играет роль регулятора некроза клеток и рецептора подавления патоген-ассоциированных молекулярных паттернов.

CD5 является T-клеточный маркером, экспрессируемым в развившихся злокачественных B-клеточных новообразованиях и других B-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваниях. Экспрессия CD5 удобна для определения скрытых моноклональных T-клеточных лимфоцитозов и диагностирования T-клеточных новообразований без лейкоцитоза и без признаков неоплазии по клеточной морфологии. В континууме у нормальных политипичных B-клеток экспрессия CD5 постоянна преимущественно на более поздних этапах созревания и в развившихся B-клетках. Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 обеспечивает более точное различие между такими различными B-клеточными пролиферациями, как B-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, мелкоклеточные лимфомы (CD5+ CD23+CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5+CD23– CD19+) (1,2,3,4,5,6).

CD5 используется в дифференциальной диагностике целого ряда лимфом с экспрессией периферической крови (проявление лейкозов), например, a) CD5-положительной фолликулярной лимфомы, b) анализа на остаточную минимальную болезнь неходжкиновских лимфом B-клеточного пути (CD5+), c) CD5-положительной фолликулярной лимфомы; d) CD5-положительной (CD5+) диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL) e) лимфомы из клеток маргинальной зоны (SP-MZL). CD5 рассматривается как независимый ненадежный прогностический признак крайне агрессивной диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (7,8).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD10 позволяет определить характеристики различных случаев B-клеточной неоплазии (6), например, B-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозов, мелкоклеточные лимфом (CD5+CD10– CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5– CD10+ CD19+) (1,2). Этот анализ также позволяет отличить острые лимфобластные B-клеточные лейкемии (B-ALL) и острые лимфобластные пре-B-клеточные лейкемии (CD5– CD10+CD19+) от пролимфоцитарных лейкозов (CD5– CD10– CD19+) (3,9,10,11,12).

Хронический лимфолейкоз (CLL) характеризуется клональной экспансией B-клеток (CD5(+)CD23(+)) в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных тканях. Анализ уровня экспрессии генов и фенотипические исследования показывают, что хронический лимфолейкоз (CLL), возможно, развивается из B-клеток CD5(+), аналогичных тем, которые обнаружен в крови здоровых взрослых индивидов (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A12689.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A12689.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5-FITC+	50	73	7,7	10,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов большинством тимоцитов и подгруппой популяции В-лимфоцитов (13,14,15). CD5 экспрессируется в подгруппе В-клеток, выделяющих IgM, из-за недостаточного объема терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) фермента, который появляется для подавления активации BSR, и, тем самым, снижает аутоиммунную реакцию. С другой стороны, Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD5, чем В-клетки. CD5 положительно регулируется в Т-клетках при сильной активации. В вилочковой железе имеется корреляция с экспрессией CD5 и интенсивностью взаимодействия Т-клеток по отношению к аутопептидам. Экспрессия CD5 не обнаружена в гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (15). Во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (Код WS: 520, раздел Т) для CD5 было назначено моноклональное антитело BL1a (13,14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD5-FITC +	12	75	0,7	0,9

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MOLT4)) и клетки отрицательной линии ((RPMI18866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD5-FITC	Y = 0,98 X + 0,73	0,9995

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	7T4-1F5
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	A unique clonotypic determinant present on the cell line used for immunization
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG2a(mouse)-PE

REF A09142 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-PE , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с PE , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с R-фикоэритрин (PE), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с PE , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -PE (Ref. A09142) адаптирован для использования с PE -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональные антитела 7T4-1F5, относящиеся к изотипическому подклассу IgG2a, не связываются специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG2a (мыши) +	12	0,17	0,002	1,17
Моноциты IgG2a (Mouse) +	12	0,32	0,007	2,28
Гранулоциты IgG2a (Mouse) +	12	0,48	0,007	1,46

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	7T4-1F5
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	A unique clonotypic determinant present on the cell line used for immunization
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG2a(мыши)-PC5

REF A09148 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-PC5 , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с PC5 , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с R-фикоэритрин-цианином 5 (PC5), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с PC5 , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -PC5 (Ref. A09148) адаптирован для использования с PC5 -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональные антитела 7T4-1F5, относящиеся к изотипическому подклассу IgG2a, не связываются специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре выполнялось 12 измерений MFI отрицательных клеток (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов цельной крови одного здорового донора). Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG2a (Mouse)-	12	0,167	0,0024	1,449
Моноциты IgG2a (Mouse) -	12	0,421	0,0157	3,736
Гранулоциты IgG2a (Mouse) -	12	0,516	0,0062	1,212

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
	Лизирующий раствор VersaLyse Lysing Solution, готовый к употреблению
Форма выпуска	Жидкость
Объем	100 мл
Число флаконов	1 флакон
Объем на одно определение	1 мл (готов к употреблению, если используется в методах, не предусматривающих одновременной фиксации)

VersaLyse

Лизирующий раствор

REF 1 мл / определение, A09777 100 определений; 100 мл

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный реактив предназначен для лизиса эритроцитов в ходе подготовки биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии. VersaLyse совместим со всеми типами цитометров и может использоваться как с отмывкой после инкубации, так и без отмывки, если в протокол исследования предусматривает окрашивание должным образом откалиброванными антителами. Образцы можно обрабатывать реактивом VersaLyse, даже если они ранее подвергались отмывке, например, с целью удаления сывороточных иммуноглобулинов (1,2,3,4,5).

ПРИНЦИП

Образец, содержащий эритроциты, подлежащие лизису, приводят во взаимодействие с реактивом VersaLyse по крайней мере на 10 минут. Основным активным ингредиентом реактива VersaLyse является циклический амин; в присутствии карбоангидразы эритроцитов он превращается в соединение, обладающее высокой литической активностью в отношении этих клеток.

Реактив можно использовать при работе с конъюгатами специфических анител, связывающихся с лейкоцитами через экспрессированные этими клетками антигенные детерминанты. Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с антителом или антителами. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, анализируют методом проточной цитометрии.

Образцы необходимо хранить при температуре от 2 до 8°C и быстро анализировать с помощью проточной цитометрии. Если анализ откладывается на несколько часов, препараты можно зафиксировать ФСБ, содержащим 0,1% формальдегида (приготовление этого буфера описано в инструкции, прилагаемой к фиксирующему раствору IOTest 3 Fixative Solution – Ref. A07800). В этом случае необходима предварительная отмывка.

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.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не храните в холодильнике, не замораживайте.
3. При инкубации с флуоресцирующими антителами минимизируйте воздействие света.
4. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Формальдегид токсичен и вызывает аллергические реакции. Возможно, формальдегид является канцерогеном. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки, глаза и одежду.
6. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
7. 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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Лизирующий раствор VersaLyse

ОСТОРОЖНО!

H315	Вызывает раздражение кожи.
H319	Вызывает серьезное раздражение глаз.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P302+P352	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P332+P313	При раздражении кожи: обратиться к врачу.
P337+P313	Если раздражение глаз продолжается: обратиться к врачу.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.

Соляная кислота 0,5 - 1,0%
Пирролидин 1 - 2%

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

VersaLyse следует хранить при температуре от 18 до 25°C. Если флакон с реактивом VersaLyse по недосмотру оказался в холодильнике, его температуру следует довести до комнатной (18 – 25°C) и использовать не менее чем через один час.

В невскрытом флаконе реактив сохраняет стабильность до даты истечения срока годности, указанной на флаконе.

После вскрытия флакона реактив сохраняет стабильность в течение 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ: Внимательно ознакомьтесь с условиями использования других антикоагулянтов, описанными в разделе АНТИКОАГУЛЯНТ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 24часов после венепункции.

ОТМЫТЫЕ ОБРАЗЦЫ

Если образцы предстоит подвергать отмывке перед окрашиванием и лизисом эритроцитов, важно удалить весь супернатант после последнего центрифугирования. Избыток буфера для отмывки в пробирке с осадком клеток может снизить эффективность реактива VersaLyse.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть менее 10^4 клеток / мкл (10^{10}/л). При необходимости образец разводят ФСБ, доводя концентрацию лейкоцитов до 5 x 10^3 клеток / мкл (5 x 10^9/л).

Концентрация эритроцитов в образце должна быть менее 6 x 10^6/мкл (6 x 10^{12}/л), поэтому рекомендуется разводить образец ФСБ, чтобы довести концентрацию эритроцитов до 5 x 10^6/мкл.

Если требуется довести до нужного уровня обе концентрации (эритроцитов и лейкоцитов), воспользуйтесь более высоким разведением. Для описанных ниже процедур объем образца (неразведенного или предварительно разведенного) на одну пробирку составляет 100 мкл.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 10, 20, 100 и 1 000 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Специфические флуоресцирующие антитела.
- Изотипические контроли.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Фиксирующий реактив: например, IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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.

A – Процедура без одновременной фиксации

Приготовление реактива

Реактив не требует приготовления. Используйте VersaLyse непосредственно из оригинального флакона.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В каждую тест-пробирку вносят антитело в количестве, рекомендованном производителем для окрашивания 5 x 10^5 лейкоцитов.
2. В каждую контрольную пробирку вносят изотипический контроль в количестве, рекомендованном производителем для окрашивания 5 x 10^5 лейкоцитов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл исследуемого образца (предварительно разведенного или неразведенного). Осторожно встряхивают пробирки на приборе Wortex.
4. Инкубируют, соблюдая условия, изложенные в описании используемых антител.
5. Добавляют 1 мл VersaLyse и немедленно встряхивают на вортексе в течение 1 секунды.
6. Инкубируют не менее 10 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.

   Если используется процедура без отмывки, пробирки готовы для цитометрического анализа.

   ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты необходимо отмывать, анализ проводят только после выполнения этапов 7 –11.
7. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.

   ВНИМАНИЕ: Замечено, что при использовании процедуры неодновременной фиксации с отмывкой могут образовываться дублеты клеток (называемые беглецами), что может приводить к получению ошибочных результатов из-за изменения светорассеивающих свойств дублетов и их выхода за пределы областей гейтинга [6].Распада дублетов можно добиться тщательным встряхиванием на приборе Vortex.
8. Удаляют супернатант аспирацией.
9. Осадок клеток ресуспендируют в 3 мл ФСБ.
10. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
11. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, пользуясь

- 0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).
- 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.

Б – Процедура с одновременной фиксацией

Приготовление реактива

Готовят ex tempore смесь “Fix-and-Lyse” («Фиксация плюс лизис») путем добавления 25 мкл НЕРАЗВЕДЕННОГО фиксирующего раствора IOTest 3 10X* Fixative Solution (Ref. A07800) к 1 мл реактива VersaLyse.

Пробирки встряхивают на вортексе в течение 3 – 5 секунд.

(*) ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ: при приготовлении смеси “Fix-and-Lyse” фиксирующий раствор IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) используется в виде раствора сорокакратной, а не номинальной десятикратной (10X) концентрации.

Готовят достаточное количество смеси «Фиксация плюс лизис», в соответствии с числом образцов, которые предполагается проанализировать (1 мл смеси на пробирку).

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

1. В каждую тест-пробирку вносят антитело в количестве, рекомендованном производителем для окрашивания 5 x 10^5 лейкоцитов.
2. В каждую контрольную пробирку вносят изотипический контроль в количестве, рекомендованном производителем для окрашивания 5 x 10^5 лейкоцитов.
3. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл исследуемого образца (предварительно разведенного или неразведенного). Осторожно встряхивают пробирки на приборе Wortex.
4. Инкубируют, соблюдая условия, изложенные в описании используемых антител.
5. Добавляют 1 мл смеси “Fix-and-Lyse” и немедленно встряхивают на вортексе в течение 1 секунды.
6. Инкубируют не менее 10 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если используется процедура без отмывки, пробирки готовы для цитометрического анализа.

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты необходимо отмывать, анализ проводят только после выполнения этапов 7 –11.

7. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
8. Удаляют супернатант аспирацией.
9. Осадок клеток ресуспендируют в 3 мл ФСБ.
10. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
11. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

    Полученные препараты можно хранить в течение 24 часов при температуре от 2°C до 8°C в защищенном от света месте.

АНТИКОАГУЛЯНТ

Независимо от того, какая используется методика – с отмывкой или без отмывки после лизиса, – наилучшие результаты получаются при использовании трикалиевой соли ЭДТА (K3EDTA).

Цитрат-декстроза и гепарин дают хорошие результаты со всеми процедурами, за исключением процедуры без одновременной фиксации, если за ней следует отмывка. Для применения с этими антикоагулятнами мы рекомендуем процедуру с одновременной фиксацией и последующей отмывкой.

АНАЛИЗ

Сигнал светорассеяния под малым углом (Forward Scatter или FS), обусловленный разрушенными эритроцитами, может в данном случае быть выше, чем при использовании других коммерческих реактивов для лизиса. Поэтому обычная установка (зафиксированная по умолчанию) порогового (« threshold ») дискриминатора для этого параметра может оказаться недостаточной, если использовался реактив VersaLyse.

Целесообразно провести настройку цитометра в первый момент накопления данных типичного препарата. В случае лизированной цельной крови, целесообразно вначале постепенно увеличивать значение дискриминатора (пока популяции лейкоцитов не станут различимы на гистограмме типа FS versus SS), а затем осторожно настроить усиление сигналов FS и SS, чтобы распределение популяций лейкоцитов стало идентичным распределениям рисунков 1 и 2.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ЧИСТОТА И ВЫХОД ЛИМФОЦИТОВ

Чистоту и выход лимфоцитов оценивали в соответствии с рекомендациями Центра по борьбе с заболеваниями (CDC) США (1). Кровь 10 здоровых доноров, стабилизированную K3EDTA, метили смесью моноклональных антител CD45-FITC и CD14-PE. Средние значения и диапазоны значений выхода и чистоты, полученные для разных процедур, приведены в нижеследующих таблицах.

Без отмывки			
Без одновременной фиксации		**С одновременной фиксацией**	
Выход	**Чистота**	**Выход**	**Чистота**
96,4	92,3	96,6	91,6
95 / 97,5	90,1 / 94,3	95,4 / 98,1	90,1 / 92,6

С отмывкой			
Без одновременной фиксации		**С одновременной фиксацией**	
Выход	**Чистота**	**Выход**	**Чистота**
95,6	94,0	96,2	97,2
95 / 97,3	90,3 / 97,3	95,4 / 97,5	92,7 / 99,4

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 31 измерение процентного содержания CD3+ лимфоцитов в образце цельной крови одного здорового донора. Использованная процедура лизиса: одновременная фиксация без отмывки. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Цельная кровь	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3+ лимфоциты	31	60,72	1,61	2,7

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (7).
4. В случае полиглобулинемии образец следует разводить ФСБ до концентрации 5 x 10^{12} эритроцитов/л (8, 9, 10).
5. Перед использованием необходимо довести реактив VersaLyse до комнатной температуры (18 – 25°C).
6. Эффективность лизиса оценивается изучением препаратов невооруженным глазом. Если препараты мутные или гистограммы светорассеяния имеют необычный вид, лизис мог быть неполным.
7. Эритробласты могут быть лизированы не полностью и занимать на гистограмме светорассеяния такое же положение, как и лейкоциты (11).
8. Ингибитор карбоангидразы ацетазоламид может полностью подавить активность VersaLyse (12).
9. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
	Готовый к употреблению лизирующий раствор OptiLyse C
Форма выпуска	Забуференный раствор, содержащий 1,5% формальдегида
Объем	100 мл
Число флаконов	1 флакон
Объем на одно определение	0,5 мл

Лизирующий раствор OptiLyse C

REF A11895 200 определений; 100 мл
0,5 мл / определение

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный реактив предназначен для лизиса эритроцитов в ходе подготовки биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии после окрашивания лейкоцитов флуоресцирующими антителами. Применение реактива OptiLyse C ограничивается образцами, которые исследуются с помощью проточных цитометров производства компании Beckman Coulter; реактив совместим с процедурами окрашивания и лизиса «без отмывки», если при этом используются должным образом откалиброванные флуоресцентные антитела.

ПРИНЦИП

Биологический образец, содержащий эритроциты, которые должны быть лизированы, инкубируют в присутствии раствора OptiLyse C, в результате чего происходит лизис эритроцитов, который сопровождается фиксацией лейкоцитов.

Вначале выполняют специфическое окрашивание лейкоцитов путем инкубации образца с выбранным антителом (или смесью антител). После этого эритроциты удаляют путем лизиса, а лейкоциты, которые в ходе этого этапа фиксируются, анализируют методом проточной цитометрии.

Препараты подлежат хранению при температуре от 2 до 8°C и быстрому исследованию с помощью проточной цитометрии; предварительная отмывка не нужна.

Проточный цитометр анализирует 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.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не храните в холодильнике, не замораживайте.
3. При инкубации с флуоресцирующими антителами минимизируйте воздействие света.
4. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
5. Формальдегид токсичен и вызывает аллергические реакции. Возможно, формальдегид является канцерогеном. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки, глаза и одежду.
6. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
7. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Лизирующий раствор OptiLyse C — ОПАСНО!

H315	Вызывает раздражение кожи.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H319	Вызывает серьезное раздражение глаз.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
	Изобутиловый спирт 0,5 - 1,5%
	Формальдегид 1 - 2%

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

OptiLyse C следует хранить при температуре от 18 до 25°C.

В закрытом флаконе реактив сохраняет стабильность до даты истечения срока годности, указанной на флаконе.

После вскрытия флакона реактив сохраняет стабильность в течение 90 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль EDTA или цитрат-декстрозу, или гепарин).

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 24часов после венепункции.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть менее 10^4 клеток / мкл (10^{10} в 1 л). При необходимости образец разводят ФСБ, доводя концентрацию лейкоцитов до 5 x 10^3 клеток / мкл (5 x 10^9 в 1 л).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Концентрация эритроцитов в образце должна быть менее 6 x 10^6 клеток /мкл (6 x 10^{12} в 1 л). В случае необходимости рекомендуется разводить образец ФСБ, чтобы довести концентрацию эритроцитов до 5 x 10^6 клеток / мкл.

Если требуется довести до нужного уровня обе концентрации (эритроцитов и лейкоцитов), воспользуйтесь более высоким разведением. В процедурах окрашивания используют по 100 мкл исследуемого образца (предварительно разведенного или неразведенного) на 1 пробирку.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов. Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100, 500 и 1 000 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные микросферы: Флуоросферы Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Специфические флуоресцирующие антитела.
- Изотипические контроли.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Фиксирующий реактив. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Приготовление реактива

Реактив не требует приготовления. Используйте OptiLyse C непосредственно из флакона.

Процедура

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки смешивают с изотипическим контролем, соответствующим выбранному специфическому реактиву для окрашивания.

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ: Так называемая процедура окрашивания и лизиса «без отмывки», описанная ниже (этапы 1 – 9), требует использования должным образом откалиброванных флуоресцентных антител.

1. В каждую тест-пробирку вносят антитело в количестве, рекомендованном производителем для окрашивания 5 x 10^5 лейкоцитов.
2. В каждую контрольную пробирку вносят изотипический контроль в количестве, рекомендованном производителем для окрашивания 5 x 10^5 лейкоцитов.
3. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл исследуемого образца (предварительно разведенного или неразведенного). Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
4. Инкубируют, соблюдая условия, изложенные в описании используемых антител.
5. Добавляют 0,5 мл реактива OptiLyse C и немедленно встряхивают на приборе Vortex в течение 1 секунды.
6. Инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
7. Добавляют 0,5 мл ФСБ и встряхивают на приборе Vortex.
8. Инкубируют не менее 5 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
9. Затем образцы анализируют с помощью проточного цитометра.

   ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты необходимо отмывать, анализ проводят только после выполнения этапов 10 – 11.
10. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
11. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл ФСБ, содержащего 0,1% формальдегида.

    ФСБ, содержащий 0,1% формальдегида, можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в десятикратной концентрации в 1 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ: Во всех случаях препараты следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте до цитометрического анализа, который следует выполнить не позже чем через 24 часа.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чистота и выход лимфоцитов

Чистоту и выход лимфоцитов оценивали в соответствии с рекомендациями Центра по борьбе с заболеваниями (CDC) США (1). Кровь 10 здоровых доноров, собранную в раствор трехзамещенной калиевой соли ЭДТА, дважды окрашивали смесью моноклональных антител к CD45 (конъюгированных с ФИТЦ) и CD14 (конъюгированных с ФЭ), которые были специально откалиброваны для использования в процедуре окрашивания и лизиса «без отмывки». Средние значения и диапазоны значений, полученные для выхода и чистоты лимфоцитов, приведены в следующей таблице:

Восстановление (%)	Чистота (%)
96,8	94,8
96,2 / 97,3	94,3 / 95,1

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) $CD45^{+}CD14^{-}$ лимфоцитов в одном и том же образце цельной крови здорового донора. Использована так называемая процедура окрашивания и лизиса «без отмывки». Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Цельная кровь	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Процентное содержание $CD45^{+}CD14^{-}$ лимфоцитов	12	99,9	0,04	0,0
СИФ $CD45^{+}CD14^{-}$ лимфоциты	12	30,78	0,28	0,9

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же образца цельной крови здорового донора усилиями двух лаборантов было выполнено 12 измерений средней интенсивности флуоресценции (СИФ) $CD45^{+}CD14^{-}$ лимфоцитов. Препараты анализировали на двух различных цитометрах. Использована так называемая процедура окрашивания и лизиса «без отмывки». Полученные результаты обобщены в следующих таблицах:

Цитометр №1:

Цельная кровь	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Процентное содержание $CD45^{+}CD14^{-}$ лимфоцитов	12	99,9	0,04	0,0
СИФ CD45+CD14– Лимфоциты	12	30,78	0,28	0,9

Цитометр №2:

Цельная кровь	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Процентное содержание $CD45^{+}CD14^{-}$ лимфоцитов	12	99,0	1,49	1,5
СИФ CD45+CD14– Лимфоциты	12	37,65	0,20	0,5

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^{9} лейкоцитов/л (2).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. В случае полиглобулинемии образец следует разводить ФСБ до концентрации 5 x 10^{12} эритроцитов/л (3, 4, 5).
5. Перед использованием необходимо довести раствор OptiLyse C до комнатной температуры (18 – 25°C).
6. Эффективность лизиса оценивается изучением препаратов невооруженным глазом. Если препараты мутные или гистограммы светорассеяния имеют необычный вид, лизис мог быть неполным.
7. Эритробласты могут быть лизированы не полностью и занимать на гистограмме светорассеяния такое же положение, как и лейкоциты (6).
8. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	7T4-1F5
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	A unique clonotypic determinant present on the cell line used for immunization
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,0 - 7,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG2a(mouse)-FITC

REF A12689 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-FITC , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с FITC , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии IOTest служит для оценки уровня неспецифического окрашивания образца моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) из серии IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с FITC , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -FITC (Ref. A12689) адаптирован для использования с FITC -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональные антитела 7T4-1F5, относящиеся к изотипическому подклассу IgG2a, не связываются специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре выполнялось 12 измерений MFI отрицательных клеток (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов цельной крови одного здорового донора). Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG2a (Mouse) -	12	0,168	0,0036	2,14
Моноциты IgG2a (Mouse) -	12	0,55	0,009	1,72
Гранулоциты IgG2a (Mouse) -	12	0,88	0,013	1,45

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	7T4-1F5
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	A unique clonotypic determinant present on the cell line used for immunization
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG2a(mouse)-APC

REF A12693 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-APC , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с APC , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии IOTest служит для оценки уровня неспецифического окрашивания образца моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с аллофикоцианином (APC) из серии IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с APC , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -APC (Ref. A12693) адаптирован для использования с APC -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональные антитела 7T4-1F5, относящиеся к изотипическому подклассу IgG2a, не связываются специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре выполнялось 12 измерений MFI отрицательных клеток (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов цельной крови одного здорового донора). Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG2a (Mouse) -	12	1,77	0,039	2,208
Лимфоциты IgG2a (Mouse) -	12	2,295	0,071	3,12
Лимфоциты IgG2a (Mouse) -	12	3,40	0,078	2,299

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагенты для изучения активации базофилов "Allergenicity Kit"

REF A17116 100 тестов

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для изучения активации базофилов "Allergenicity Kit" остоит из оптимизированной трехцветной комбинации коньюгированных с флуорохромами антител, раствора для активации, положительного контроля для IgE-опосредованной активации базофилов, раствора для остановки реакции, лизирующего раствора и фиксирующего раствора.

Набор предназначен *«для диагностики in vitro»* для обнаружения активированных базофилов. Он позволяет четко гейтировать базофилы в образцах цельной крови (CRTH2posCD203c^{pos}CD3^{neg}).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Реагенты в составе данного набора позволяют обнаружить и найти отличия между покоящимися и активированными базофилами с помощью проточной цитометрии. Для этой цели используется трехцветная комбинация антител, которая представляет собой смесь двухцветных мышиных моноклональных антител (CD203c-PE и CD3-PC7) и одноцветных крысиных моноклональных антител (CRTH2-FITC).

Реагент CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7

CRTH2

Субпопуляции Т-хелперов 1 типа (Th1) и Т-хелперов 2 типа (Th2) различаются по профилю продукцируемых ими цитокинов.

Известно, что Th1-клетки участвуют в клеточном иммунном ответе, а Th2-клетки ответственны за развитие гуморального иммунного ответа и аллергических реакций. Более того, Th1 и Th2- подобные цитокиновые профили также называют иммунный ответ 1 и 2 типа, соответственно (1,2,3,4).

CRTH2 представляет собой молекулу с семью трансмембранными доменами. Это молекула, гомологичная рецептору к хемоаттрактантам. У человека CRTH2 экспрессируется предпочтительно на Th2-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах (Tc2), но не обнаруживается на Th1 и Tc1-клетках (5).

CRTH2 и рецептор простагландина D (DP) сопряжены с G-белками и являются рецепторами простагландина D2 (PGD2), однако при связывании их с лигандом активируются различные внутриклеточные сигнальные пути (6,7). PGD2 является основным метаболитом арахидоновой кислоты, который вырабатывается активированными аллергеном тучными клетками и является липидным медиатором воспаления при различных аллергических реакциях (6). CRTH2 считается также надежным поверхностным маркером, избирательным по отношению к тем циркулирующим Т-лимфоцитам (Th и Tc), которые способны к синтезу IL-4 (а также IL-5 и IL-13) и не способными к синтезу IFNγ (5,8).

Моноклональные антитела BM16 преципитируют белок с молекулярным весом от 55 до 70 кДа из лизата клеток линии JURKAT, трансфицированных геном CRTH2, и из определенного клона Th2-клеток (например, клона 6L21), соответствующего рецептору PGD2 (9).

Среди лейкоцитов цельной крови здоровых доноров CRTH2 сильно экспрессируется на базофилах и эозинофилах, а также на Th2 и Tc2-клетках, которые отвечают за развитие гуморального иммунитета и аллергических реакций (10,11).

CD203c

Базофилы и тучные клетки являются гемопоэтическими эффекторными клетками, задействованными в процесс развития аллергических и воспалительных реакций (12,13,14). Оба типа клеток сильно экспрессируют высокоаффинный рецептор IgE (FcεR1). Моноклональные антитела 97A6 распознают поверхностный антиген, который экспрессируется исключительно на базофилах периферической крови человека и не экспрессируется на других клетках крови (15). Эти антитела также взаимодействуют со зрелыми тучными клетками и CD34-положительными клетками-предшественниками базофилов и тучных клеток в костном мозге. Кроме того, экспрессия антигена 97A6 увеличивается после активации базофилов антителами к IgE и различными аллергенами (16).

Маркер активации базофилов, распознаваемый моноклональными антителами 97A6, идентичен эктонуклеотид-пирофосфатазе/фосфодиэстеразе 3 (E-NPP3), которая представляет собой трансмембранный белок II типа и принадлежит к семейству эктоэнзимов, участвующих в гидролизе внеклеточных нуклеотидов (17).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

На седьмой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (7th HLDA Workshop), проходившей в Харрогите, Англия, в 2000 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 97A6 направлены против CD203c (WS Code: MC10, Section New CD antigens)(17).

CD3

Антиген CD3 представляет собой белковый комплекс, который состоит из 5 полипептидных цепей (γ, δ, ε, ζ и η), связанных с Т-клеточным рецептором (TCR) (18,19). Антиген CD3 экспрессируется только на поверхности зрелых Т-лимфоцитов и субпопуляции тимоцитов (20). Около 67 - 76% лимфоцитов периферической крови являются положительными по CD3, причем у маленьких детей содержание Т-лимфоцитов ниже и их количество изменяется с возрастом (21).

Моноклональные антитела UCHT1 взаимодействуют с ε-цепью комплекса CD3 (22). На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что моноклональные антитела UCHT1 направлены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (23).

Allergenicity Положительный контроль

Базофилы экспрессируют высокоаффинный рецептор IgE (FcεR1). Антитела к IgE распознают иммуноглобулины Е, связанные с рецепторами, и, следовательно, вызывают активацию базофилов. Данный реагент является положительным контролем IgE-опосредованной активации базофилов.

Allergenicity Раствор для активации

Данный раствор представляет собой оптимизированный буфер с высоким содержанием кальция, который позволяет активировать in vitro базофилы в составе цельной крови, собранной в пробирки с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА (этилендиаминтетраацетата).

Allergenicity Раствор для остановки реакции

Данный раствор представляет собой оптимизированный буфер с высоким содержанием ЭДТА, который позволяет остановить процесс активации базофилов in vitro.

Allergenicity Лизирующий раствор

Для анализа образца методом проточной цитометрии необходимо подготовить монодисперсную суспензию клеток и элиминировать затрудняющие анализ эритроциты. Поэтому образец для иммунофенотипирования должен быть соответствующим образом подготовлен к окрашиванию и анализу (24,25,26). Для пробоподготовки обычно используют один из двух методов: лизирование эритроцитов или разделение мононуклеарных клеток и эритроцитов в градиенте плотности.

Данный реагент предназначен для лизиса эритроцитов при подготовке биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии. Его основным компонентом является циклический амин, который в присутствии карбоангидразы эритроцитов превращается в соединение, способное лизировать эритроциты.

Лизирующий раствор подходит для проточных цитофлуориметров любого типа при условии использования откалиброванных флуоресцентных антител.

Allergenicity Фиксирующий раствор

Фиксирующий раствор из набора Allergenicity Kit позволяет приготовить образец цельной крови путем фиксации суспензии клеток во процессе лизиса эритроцитов. Этот раствор также используется для фиксирования готовой пробы до анализа на проточном цитофлуориметре.

ПРИНЦИП

Исследуемая популяция клеток окрашивается моноклональными антителами в присутствии аллергена или контролей. Затем проводится лизис эритроцитов и анализ полученных образцов на проточном цитофлуориметре.

Для каждого образца крови выполняют как минимум три анализа:

- ♦ Пробирка # “Neg” = Пробирка с негативным контролем
- ♦ Пробирка # “Pos” = Пробирка с положительным контролем
- ♦ Пробирки “Test” (рекомендуется использовать аллерген в разных разведениях)

Эритроциты в каждом из образцов лизируются смесью “Fix-and-Lyse”, а интактные клетки анализируются с помощью проточной цитометрии.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на гистограмме, отображающей светорассеяние клеток в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

боковом направлении (Side Scatter или SS) и малоугловое светорассеяние (Forward Scatter или FS). Для гейтирования популяций также можно использовать другие двухпараметрические гистограммы.

Флуоресценция ограниченной популяции клеток анализируется, чтобы отличить положительно окрашенные события от неокрашенных.

КЛИНИЧЕСКИЕ ЗНАЧИМОСТЬ

Базофилы как первичные эффекторные клетки играют ключевую роль в развитии реакции гиперчувствительности немедленного типа. Эти клетки экспрессируют высокоаффинный рецептор IgE (FcεR1). Аллергены вызывают активацию базофилов путем перекрестного связывании поверхностных IgE, что приводит к высвобождению медиаторов и экспрессии активационных маркеров на поверхности базофилов. В ответ на экспозицию аллергена на поверхности сенсибилизированных базофилов пациента происходит увеличение экспрессии CD203c.

Анализ антигена CD203c позволяет у сенсибилизированных пациентов обнаружить покоящиеся и активированные базофилы при моделировании IgE-зависимого ответа на аллергены (16,27,28,29,30).

РЕАГЕНТЫ

1. Набор реагентов рассчитан на 100 тестов и имеет следующий состав:

- Allergenicity CRTH2-FITC / CD203c-PE / CD3-PC7 – 1 флакон (2 мл, жидкий) – 20 мкл/тест.
- Allergenicity Положительный контроль – 1 флакон [0,2 мг, лиофильно высушенный в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл – 20 мкл/тест.
- Allergenicity Раствор для активации – 2 флакона. (2x5 мл, жидкий, содержит кальций в буферном растворе) – 100 мкл/тест.
- Allergenicity Раствор для остановки реакции – 1 флакон (10 мл, жидкий, содержит ЭДТА и 0,1% азида натрия) – 100 мкл/тест.
- Allergenicity Лизирующий раствор – 3 флакона (3x100 мл, жидкий, содержит в качестве основного активного вещества циклический амин) – 2 мл/тест.
- Allergenicity Фиксирующий раствор – 1 флакон (10 мл, жидкий, содержит 8% муравьиной кислоты).

Не допускается использование реагентов из набора по отдельности. При выполнении анализа убедитесь в том, что номер лота на этикетках флаконов один и тот же.

2. Реагент Allergenicity CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7

Сводка характеристик антител

	КЛОН 1	**КЛОН 2**	**КЛОН 3**
Специфичность	CRTH2	CD203c	CD3
Клон	BM16	97A6	UCHT1
Гибридома	SP2/O-Ag8 × крысы линии Wistar	SP2/0 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Линия CRTH2-трансфецированных клеток (TART/B19-12.10)	Мегакариобластная клеточная линия UT-7	Т-клетки линии + IL2
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид	Крыса	Мышь	Мышь
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)	R Фикоэритрин, ковалентно связанный с Цианином 7 (PC7)
Молярное соотношение	5–7 молей FITC на 1 моль Ig	0,5–1,5 моля PE на 1 моль Ig	0,5–1,5 моля PC7 на 1 моль Ig
λ возбуждения	488 nM	488 nM	488 nM
Пик эмиссии	525 nm	575 nm	750–810 нм
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	КЛОН 1	КЛОН 2	КЛОН 3
Основной цвет в эмиссионном спектре	Зеленый	Оранжево-красный	Дальний красный
Буфер	Фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл и 0,1% NaN3		

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
2. 6.2 Некоторые реагенты в составе данного набора содержат 0,1% азид натрия. В кислой среде азид натрия образует азотисто-водородную кислоту, являющуюся потенциально опасным соединением. Азидные соединения рекомендуется утилизировать путем слива в водопроводно-канализационную систему под проточной водой. Это позволит избежать накопления азида натрия в металлических трубах и предотвратить образование взрывчатых веществ. При попадании реагента на кожу или в глаза промойте их большим количеством воды.
3. 6.3 Фиксирующий раствор Allergenicity Fixative Solution содержит формальдегид в качестве фиксатора. Формальдегид опасен для человека как в концентрации 8%, так и в концентрации 0,8%. Не вдыхайте пары формальдегида, избегайте попадания в глаза, на кожу или одежду. Формальдегид токсичен и может вызывать аллергические реакции. Формальдегид также считается канцерогеном.
4. 6.4 Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом. Избегайте контакта образца и реагентов с кожей и слизистыми оболочками.
5. 6.5 Не используйте реагенты с истекшим сроком годности (срок годности указан на этикетке флакона).
6. 6.6 Не замораживайте реагенты (за исключением аликвот положительного контроля).
7. 6.7 Не нагревайте реагенты во время использования и хранения.
8. 6.8 При нарушении времени инкубации и перемешивания или температурного режима возможно получение недостоверных результатов.
9. 6.9 Плотно закрывайте флаконы с реагентами после использования во избежание испарения или утечки содержимого, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
10. 6.10 При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
11. 6.11 Не подвергайте реагенты воздействию яркого света во время хранения и инкубации.
12. 6.12 Избегайте контаминации реагента микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
13. 6.13 Рекомендуется использовать те же лизирующие растворы, антитела и проточные цитофлуориметры, что использовались для вычисления ожидаемых результатов, в противном случае полученные результаты могут отличаться от ожидаемых.
14. 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.
15. 6.15 При работе с реагентами необходимо следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
16. 6.16 Храните лизирующий раствор Allergenicity Lysing Solution при комнатной температуре. Если раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
17. 6.17 Если упаковка реагентов нарушена или были получены недостоверные результаты, свяжитесь с вашим представителем компании Beckman Coulter.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Раствор для фиксации

ОПАСНО!

H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
H313	Может нанести вред при контакте с кожей
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H335	Может вызывать раздражение дыхательных путей.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.

Формальдегид 5 - 10%

Лизирующий раствор VersaLyse

ОСТОРОЖНО!

H315	Вызывает раздражение кожи.
H319	Вызывает серьезное раздражение глаз.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P302+P352	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P332+P313	При раздражении кожи: обратиться к врачу.
P337+P313	Если раздражение глаз продолжается: обратиться к врачу.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.

Соляная кислота 0,5 -1%
Пирролидин 1 - 2%

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ

1. Условия хранения

   Все реагенты должны храниться при температуре 2–8°C за исключением следующих случаев:

- Раствор для лизиса эритроцитов Allergenicity Lysing Solution: хранить при температуре 18–25°C.

  Лизирующий раствор из набора Allergenicity Kit следует хранить и использовать при комнатной температуре.

  Если лизирующий раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной.

- Положительный контроль для набора Allergenicity Kit: после ресуспендирования храните аликвоты при температуре –20°C (см. раздел 7.3.2).

2. Стабильность

   При хранении при температуре 2–8°C реагенты набора Allergenicity Kit стабильны до окончания срока годности, указанного на этикетке. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

   После вскрытия упаковки реагенты стабильны в течение 90 дней.

3. Подготовка реагентов для анализа

   Перед использованием реагентов необходимо дождаться, пока температура всех реагентов достигнет комнатной (18–25°C).

   A. Реагенты, готовые к использованию

- CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7;
- Allergenicity раствор для активации
- Allergenicity раствор для остановки реакции

  Эти реагенты готовы к использованию прямо из флакона.

   B. Приготовление других реагентов

   a. Allergenicity Положительный контроль

   Ресуспендируйте лиофилизованный положительный контроль в 1 мл профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм деионизированной воды для получения концентрации вещества 0,2 мг/мл.

   Мы рекомендуем аликвотировать полученный раствор и хранить при температуре –20°C. Для получения рабочего раствора разморозьте одну аликвоту и разведите ее в соотношении 1:20.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовьте достаточное количество положительного контроля, чтобы хватило на все приготовленные пробы. В качестве примера расчетов используйте следующую таблицу:

	Allergenicity Положительный контроль	**Фосфатно-солевой буфер (PBS)**
На 10 пробирок с положительным контролем	10 мкл	190 мкл
На 20 пробирок с положительным контролем	20 мкл	380 мкл
На 50 пробирок с положительным контролем	50 мкл	950 мкл

b. Приготовление раствора для лизиса с одновременной фиксацией.

Allergenicity лизирующий расвтор (3×100 мл): используйте реагент непосредственно из флакона.

Allergenicity Фиксирующий раствор (1×10 мл): используйте реагент непосредственно из флакона.

Раствор для готовится на основе растворов Allergenicity Lysing Solution и Allergenicity Fixative Solution) в день проведения анализа на все количество проб. Не замораживайте рабочий раствор для лизиса с одноврменный фиксацией. Не храните остатки готового раствора для лизиса с одноврменный фиксацией.

Приготовьте необходимое количество раствора для фиксации и лизиса в зависимости от количества проб. В качестве примера расчетов используйте следующую таблицу:

	Allergenicity Лизирующий раствор	**Allergenicity Фиксирующий раствор**
На 10 пробирок	20 мл	0,5 мл
На 20 пробирок	40 мл	1 мл
На 50 пробирок	100 мл	2,5 мл

c. Приготовление 0,1% раствора формальдегида

Приготовьте 0,1% раствор формальдегида в PBS. Для этого разведите 12,5 мкл Allergenicity фиксирующего раствора в 1 мл PBS (пример расчета на 2 пробирки). Приготовьте необходимое количество 0,1% раствора формальдегида в PBS в зависимости от количества проб.

Приготовьте необходимое количество буферного раствора в зависимости от количества проб. В качестве примера расчетов используйте следующую таблицу:

	Фосфатно-солевой буфер (PBS)	**Allergenicity Фиксирующий раствор**
На 10 пробирок	5 мл	62,5 мкл
На 20 пробирок	10 мл	125 мкл
На 50 пробирок	25 мл	312 мкл

ПОЛУЧЕНИЕ, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Требования к образцам

A. 9.1.1 Забор периферической крови нужно выполнять асептическим способом в стерильную пробирку, содержащую ЭДТА в качестве антикоагулянта. До начала подготовки проб образцы крови с ЭДТА следует хранить при комнатной температуре (18–25°C).

B. 9.1.2 Образцы крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта следует проанализировать в течение 24 часов с момента забора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

C. 9.1.3 Объем отбираемых образцов периферической крови должен быть оптимальным (т. е. более половины общего объема пробирки).

D. 9.1.4 Можно использовать гепаринизированную цельную кровь, однако следует придерживаться модифицированной процедуры (см. раздел 9.3). Следует использовать свежие образцы.

E. 9.1.5 Для анализа образцов следует использовать реагенты из одного набора.

F. 9.1.6 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 забора крови.

2. Настройка прибора

A. Проточный цитофлуориметр должен быть оснащен детекторами прямого и бокового светорассеивания (FS и SS), а также тремя каналами регистрации флуоресценции антител, конъюгированных с FITC, PE и PC7 (максимумы пиков эмиссии, соответственно, 504-541 / 568-590 / 750-810 нм).

B. 9.2.2 Убедитесь в корректности настроек лазера и настроек напряжения на фотоумножителях (в соответствии с рекомендациями изготовителя).

C. 9.2.3 Убедитесь в корректности настроек компенсации флуоресценции.

Примерные настройки для фотоумножителей на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter (проточный цитофлуориметр EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением EXPO32)

С помощью калибровочных частиц Flow-Set отрегулируйте настройки фотоэлектронных умножителей таким образом, чтобы поместить пики распределения частиц Flow-Set по светорассеиванию и интенсивности флуоресценции в указанные целевые диапазоны:

Целевые значения	
Параметр	**Диапазон**
Светорассеивание в прямом направлении (FS)	116–132
Светорассеивание в боковом направлении (SS)	370–432
LOG FL1 (FITC)	22,5–24,2
LOG FL2 (PE)	37,5–50,5
LOG FL4 (PC7)	235–270

Для оптимальной настройки проточного цитометра следуйте указаниям Инструкции по применению флуоросфер Flow-Set и набора PC7 Set-up Kit (см. раздел 8).

3. Процедура пробоподготовки

- Приведенная процедура оптимизирована для анализа образцов цельной крови, собранных в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта.
- При пробоподготовке свежих гепаринизированных образцов цельной крови следует пропустить шаг 3 (т. е. этап добавления 100 мкл активирующего раствора).
- Перед использованием реагентов необходимо дождаться, пока температура всех реагентов достигнет комнатной (18–25°C).
- Каждая лаборатория должна определить собственные диапазоны разведения аллергенов.

Каждый раз перед проведением анализа промаркируйте необходимое количество пробирок:

- ♦ Пробирка # “Neg” = Пробирка с негативным контролем
- ♦ Пробирка # “Pos” = Пробирка с положительным контролем
- пробирка «Test» — аллерген (различные разведения аллергена).

1. Добавьте:

- – 20 мкл PBS в пробирку «Neg» (отрицательный контроль);
- – 20 мкл раствора Allergenicity Положительный контроль в пробирку «Pos» (положительный контроль);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- – 20 мкл анализируемого аллергена в пробирку «Test».

2. Добавьте в каждую пробирку по 20 мкл реагента CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7.
3. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл Раствора для активации.
4. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл цельной крови.
5. Аккуратно перемешайте содержимое каждой пробирки на вортексе и инкубируйте на водяной бане в течение 15 минут при температуре 37°C в защищенном от света места.
6. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл Раствора для остановки реакции и аккуратно перемешайте на вортексе в течение 5 секунд.

   Предупреждение: Allergenicity Лизирующий раствор следует хранить и использовать при комнатной температуре, в противном случае качество лизиса может ухудшиться. Если лизирующий раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной.
7. Добавьте в каждую пробирку по 2 мл раствора для лизирования с одновременной фиксацией и перемешайте на вортексе.
8. Инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре (18–25°C) в защищенном от света месте.
9. Отцентрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 200 × g и удалите супернатант аспирацией.
10. Добавьте в каждую пробирку по 3 мл PBS.
11. Отцентрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 200 × g и удалите супернатант аспирацией.
12. Ресуспендируйте осадок клеток в 0,5 мл 0,1% раствора формальдегида в PBS.
13. Проанализируйте пробы на проточном цитофлуориметре.

Если готовые пробы не удается проанализировать на цитометре в течение 1 часа, их следует хранить при температуре 2-8°C в защищенном от света месте. Рекомендуется выполнить анализ готовых проб в течение 4 часов.

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Деионизированная вода.
2. 8.2 Фосфатно-солевой буфер (PBS) (каталожный номер 6602489).
3. 8.3 Пробирки для сбора крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта (если в качестве антикоагулянта используется гепарин, см. раздел «Порядок анализа образцов»).
4. 8.4 Флуоросферы Flow-Set (каталожный номер 6607007).
5. 8.5 PC7 Set-up Kit (каталожный номер 6607121).
6. 8.6 Реагенты для настройки компенсации флуоресценции FITC, PE, PC7.
7. 8.7 Соответствующие изотипические контроли:
   A. Иммуноглобулин мыши IgG1-PE (каталожный номер A07796).
   B. Иммуноглобулин мыши IgG1-PC7 (каталожный номер 6607099).
8. Пластиковые пробирки (12 x 75 мм).
9. 8.9 Водяная баня (37°C).
10. Мешалка типа Вортекс (вихревой смеситель).
11. Таймер.
12. 8.12 Откалиброванные пипетки для многократного дозирования (20 мкл, 100 мкл и 2 мл) и наконечники.
13. 8.13 Пробирки для замораживания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

14. Проточный цитометр.

15. 8.15 Аллергены.

ПРОЦЕДУРА

	Пробирка «Neg» (отрицательный контроль)	Пробирка «Pos» (положительный контроль)	Пробирка «Test»
Фосфатно-солевой буфер (PBS)	20 мкл		
Положительный контроль		20 мкл	
Аллергены			20 мкл
CRTH2-FITC/CD203c-PE/ CD3-PC7	20 мкл	20 мкл	20 мкл
Раствор для активации	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Цельная кровь с ЭДТА	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Аккуратно перемешайте на вортексе			
Инкубируйте в течение 15 минут при температуре 37°C в защищенном от света месте (РЕКОМЕНДУЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ВОДЯНУЮ БАНЮ)			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Аккуратно перемешайте на вортексе			
Раствор для лизирования с одновременной фиксацией	Предупреждение: Allergenicity Лизирующий раствор следует хранить и использовать при комнатной температуре, в противном случае качество лизиса может ухудшиться. Если лизирующий раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной.		
	2 мл	2 мл	2 мл
Аккуратно перемешайте на вортексе			
Инкубируйте в течение 10 минут при температуре 18–25°C в защищенном от света месте			
Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 200 × g Удалите супернатант аспирацией			
Фосфатно-солевой буфер (PBS)	3 мл	3 мл	3 мл
Отмывка: Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 200 × g Удалите супернатант аспирацией Ресуспендируйте в 0,5 мл 0,1% раствора формальдегида в PBS			
Выполните анализ на проточном цитофлуориметре Закончите сбор данных, когда будет накоплено 500 базофилов (регион C)			

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.

Общее количество базофилов	Номер	Среднее (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
$CRTH2^{pos}$ $CD203c^{pos}$ $CD3^{neg}$	50	0,62	0,31	51

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях было проведено исследование образцов цельной крови 50 здоровых людей с использованием вышеописанного реагента. В приведенной таблице представлены результаты подсчета положительных событий.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре в одном образце определялось процентное содержание всех неактивированных и активированных базофилов (после стимуляции антителами к IgE in vitro). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Базофилы	Номер	Среднее (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Активированные	12	94,26	1,06	1,1
Неактивированные	12	5,39	1,33	24,6
Общая	12	0,54	0,05	8,5

Линейность

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии (KU812 или MOLT16) и клетки отрицательной линии (KG-1a). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты суспензий клеток окрашивали трехцветной комбинацией антител. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия. Параметры уравнения линейной регрессии могут использоваться для определения линейности и диапазона измерения.

Специфичность	Проанализированные клеточные линии	Линейность (R^2)	Диапазон значений (%)
CRTH2-FITC	MOLT16 + KG-1a	0,99	0,1–90
CD203c-PE	KU812 + KG-1a	0,99	0,1–97
CD3-PC7	MOLT16 + KG-1a	0,99	2,0–98

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. 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 количеством клеток в образце.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Перед использованием реагентов необходимо дождаться, пока их температура достигнет комнатной (18–25°C).
5. Эффективность лизиса оценивается изучением препаратов невооруженным глазом. Если препараты мутные или гистограммы светорассеяния имеют необычный вид, лизис мог быть неполным.
6. Эритробласты могут быть лизированы не полностью и занимать на гистограмме светорассеяния такое же положение, как и лейкоциты (31).
7. Ацетазоламид, являющийся ингибитором карбоангидразы, способен полностью ингибировать действие лизирующего раствора.
8. В связи с тандемной структурой флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик эмиссии различен в разных сериях PC7. Поэтому для целей многоцветного анализа компенсационную матрицу следует тщательно контролировать при смене серии PC7-конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Пример анализа образцов

1. Настройка протокола

   Проточный цитофлуориметр должен быть оснащен детекторами прямого и бокового светорассеивания (FS и SS), а также детекторами регистрации флуоресценции антител, конъюгированных с FITC, PE и PC7.

2. Построение гистограмм

   Для обнаружения покоящихся и активированных базофилов постройте следующие гистограммы:

   A. Гистограмма 1: Прямое светорассеивание FS — Боковое светорассеивание SS.

   B. Гистограмма 2: CD3-PC7 — Боковое светорассеивание SS.

   C. Гистограмма 3: CRTH2-FITC — CD203c-PE.

   D. Гистограмма 4: CRTH2-FITC — CD203c-PE.

3. Создание регионов

   Создайте следующие регионы:

   A. На гистограмме 1 создайте аморфный/полигональный регион A, включив в него все лейкоциты и исключив агрегаты клеток и дебрис от лизированных эритроцитов.

   B. На гистограмме 2 создайте прямоугольный регион B, включив в него все лимфоциты и моноциты и исключив клетки $CD3^{bright}$ (Т-лимфоциты).

   C. На гистограмме 3 создайте прямоугольный регион C, включив в него все клетки с фенотипом $CRTH2^{pos}CD203c^{pos}CD3^{neg}$.

   D. На гистограмме 4 создайте квадрантный регион D, включив в него все клетки с фенотипом $CRTH2^{pos}CD203c^{pos}CD3^{neg}$.

4. Создание гейтов

   Создайте области селекции следующим образом:

   A. Гистограмма 1: не гейтированная, отображает все полученные при сборе данных события.

   B. Гистограмма 2: Примените гейт A к гистограмме 2, для того чтобы отобразить все лейкоциты, но исключить из зоны анализа агрегаты клеток и дебрис от лизированных эритроцитов.

   C. Гистограмма 3: Примените гейты A и B (AB) к гистограмме 3, для того чтобы отобразить все базофилы с фенотипом $CRTH2^{pos}CD203c^{pos}CD3^{neg}$.

   D. Гистограмма 4: Примените гейты A, B и C (ABC) к гистограмме 4, для того чтобы отобразить все события с фенотипом $CRTH2^{pos}CD203c^{pos}CD3^{neg}$.

5. Пример анализа

   См. Приложение.

6. Подсчет количества исследованных базофилов

   См. Приложение.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD2
Клон	39C1.5
Гибридома	X63 x rat
Иммуноген	PHA-stimulated human lymphoblasts
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Крыса
Очистка	Ионообменная или аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD2-PC7

REF A21689 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD2, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD2 присутствует на приблизительно 80% лимфоцитов периферической крови у здорового человека, на 95% тимоцитов и на 100% Т-клеточных лимфоцитов (1). Континуум слабой экспрессии антигена CD2 был описан для моноцитов, наиболее положительные из которых демонстрируют характеристики дифференцировки дендритных клеток (2). CD2 экспрессирует на большинстве Т-клеток и NK-клеток человека и играет важную роль в передаче сигнала и в опосредовании клеточной адгезии в Т-лимфоцитах и NK-клетках (3). Преобладающее преимущество Т-клеточных лимфом и лейкозов также экспрессирует CD2, благодаря чему возможно использовать присутствие антигена для отличения этих состояний от В-клеточных новообразований.

В то время как CD2 не является строго специфичным для линии Т-клеток маркером, он полезен при идентификации Т-клеточной лимфобластной лимфоме (T-LBL). T-LBL представляет примерно 2% всех лимфом и обычно TdT-положительная и по-разному экспрессирует CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 и CD8 (4). Подобным образом, CD2 также является полезным маркером для идентификации клеток острого Т-клеточного лейкоза-лимфомы (ATLL), которые обычно экспрессируют цитоплазменные CD3, CD2/CD5/CD30/CD25 и CD1a, но отрицательны на TdT и мембранные CD3/CD7/CD4/CD8/CD34/CD10 (5). Изредка CD2 ошибочно экспрессирует на опухолевых клетках миелоидной линии. Уникальная экспрессия CD2 на миелоидных клонах может быть полезной для определения минимального остаточного заболевания (6, 7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Крыса Изотипический контроль PC7: Реактив IOTest .
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
3. 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.
4. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
5. Удаляют супернатант аспирацией.
6. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
7. Повторяют этап 5.
8. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD2-PC7+	50	82,05	6,65	8,1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD2 рассмотривается как член суперсемейства иммуноглобулинов; у него есть два иммуноглобилинподобных домена во внеклеточной части (8, 9). Экспрессия CD2 и молекулярное взаимодействие связано с человеческим опосредованным Т-лимфоцитами цитолизом (10). Молекула клеточной адгезии CD2 и ее лиганд CD58 предлагают хорошие примеры взаимодействия белок-белок в клетке, принимающего участия в иммунном ответе. Кроме того, внутриклеточные сигнальные пути и сети CD2 открываются путем идентификации нескольких белков, связывающих цитозольный хвост (11). Недавно было продемонстрировано, что взаимодействие рецептор-лиганд CD2-CD58/48 способствует образованию нанотрубок и требуется для него в человеческих NK-клетка, содействуя цитотоксической функции NK-клеток (12). Моноклональное антитело 39C1.5 ингибирует розеткообразование с бараньими эритроцитами (13).

Он был отнесен к CD2 во время семинара 2nd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: 144, секция T) (14, 15).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD2-PC7 +	12	90,03	0,53	0,6

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((JURKAT)) и клетки отрицательной линии ((RAMOS)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD2-PC7	Y = 1,00 X – 0,45	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD5
Клон	BL1a
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from human thoracic duct
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD5-PC7

REF A21690 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD5, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD5 является многофункциональным рецептором, экспрессируемым в сочетании с антиген-специфическими рецепторами на лимфоциты T и B-1a. CD5 играет роль регулятора некроза клеток и рецептора подавления патоген-ассоциированных молекулярных паттернов.

CD5 является T-клеточный маркером, экспрессируемым в развившихся злокачественных B-клеточных новообразованиях и других B-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваниях. Экспрессия CD5 удобна для определения скрытых моноклональных T-клеточных лимфоцитозов и диагностирования T-клеточных новообразований без лейкоцитоза и без признаков неоплазии по клеточной морфологии. В континууме у нормальных политипичных B-клеток экспрессия CD5 постоянна преимущественно на более поздних этапах созревания и в развившихся B-клетках. Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 обеспечивает более точное различие между такими различными B-клеточными пролиферациями, как B-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, мелкоклеточные лимфомы (CD5+ CD23+CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5+CD23– CD19+) (1,2,3,4,5,6).

CD5 используется в дифференциальной диагностике целого ряда лимфом с экспрессией периферической крови (проявление лейкозов), например, a) CD5-положительной фолликулярной лимфомы, b) анализа на остаточную минимальную болезнь неходжкиновских лимфом B-клеточного пути (CD5+), c) CD5-положительной фолликулярной лимфомы; d) CD5-положительной (CD5+) диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL) e) лимфомы из клеток маргинальной зоны (SP-MZL). CD5 рассматривается как независимый ненадежный прогностический признак крайне агрессивной диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (7,8).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD10 позволяет определить характеристики различных случаев B-клеточной неоплазии (6), например, B-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозов, мелкоклеточные лимфом (CD5+CD10– CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5– CD10+ CD19+) (1,2). Этот анализ также позволяет отличить острые лимфобластные B-клеточные лейкемии (B-ALL) и острые лимфобластные пре-B-клеточные лейкемии (CD5– CD10+CD19+) от пролимфоцитарных лейкозов (CD5– CD10– CD19+) (3,9,10,11,12).

Хронический лимфолейкоз (CLL) характеризуется клональной экспансией B-клеток (CD5(+)CD23(+)) в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных тканях. Анализ уровня экспрессии генов и фенотипические исследования показывают, что хронический лимфолейкоз (CLL), возможно, развивается из B-клеток CD5(+), аналогичных тем, которые обнаружен в крови здоровых взрослых индивидов (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. A12692.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A12692.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD5-PC7+	50	73,32	7,7	11

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов большинством тимоцитов и подгруппой популяции В-лимфоцитов (13,14,15). CD5 экспрессируется в подгруппе В-клеток, выделяющих IgM, из-за недостаточного объема терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) фермента, который появляется для подавления активации BSR, и, тем самым, снижает аутоиммунную реакцию. С другой стороны, Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD5, чем В-клетки. CD5 положительно регулируется в Т-клетках при сильной активации. В вилочковой железе имеется корреляция с экспрессией CD5 и интенсивностью взаимодействия Т-клеток по отношению к аутопептидам. Экспрессия CD5 не обнаружена в гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (15). Во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (Код WS: 520, раздел Т) для CD5 было назначено моноклональное антитело BL1a (13,14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD5-PC7 +	12	76,80	0,65	0,85

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MOLT4)) и клетки отрицательной линии ((RPMI18866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD5-PC7	Y = 1,0028 X + 0,4221	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-PC7

REF A21691 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD34, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от BM-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. 737662.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD34-PC7+	10	0,12	0,07	62,3

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (13).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD34-PC7 +	12	59,57	0,41	0,70

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((KG-1a)) и клетки отрицательной линии ((RPMI8866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD34-PC7	Y = 0,9822 X +0,7659	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (14).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (15).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD56
Клон	N901 (NKH-1)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human chronic myeloid leukemia (hCML) cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD56-PC7

REF A21692 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD56, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Моноклональные антитела N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, который экспрессируется большинством натуральных киллеров (NK-клеток) периферической крови (1,2), а также субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3). NK-клетки характеризуются собственной и специфической цитотоксической активностью, которая проявляется, когда нарушается равновесие ингибирующих сигналов от иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (ИРК) и активирующих сигналов от рецепторов естественной цитотоксичности (РЕЦ). Таким образом, когда ИРК узнают достаточное число молекул HLA I на поверхности клетки-мишени, они подают в NK-клетки сигнал, способный ингибировать лизис. Напротив, если число таких молекул HLA недостаточно (случай опухолевых или инфицированных вирусом клеток), литический сигнал от РЕЦ не ингибируется, что приводит к лизису клетки-мишени (4).

У здоровых людей среди примерно 15% от общего числа лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих антиген NKH-1, более 95% клеток обладают как неспецифической, так и специфической цитотоксической активностью. Этот реагент позволяет характеризовать клеточные популяции или субпопуляции с NK и/или цитотоксической активностью, ассоциированной с фенотипом CD56+. Он также позволяет изучать эти популяции при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (2), аутоиммунные состояния, гиперчувствительность, вирусные инфекции и восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа (5). Наконец, он может быть полезен при фенотипировании злокачественных дискразий крови, таких как лейкемии и лимфомы (6,7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD56-PC7+	20	22,2	10,4	47

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулярная масса сильно гликированного белка CD56 (молекулы NKH1) составляет 200–220 kDa (1,3). Он экспрессирует на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, которые демонстрируют не ограниченную главным комплексом гистосовместимости цитотоксичность (1,2). Моноклональное антитело N901 (NKH-1) вступает в реакцию с большинством NK-клеток (1,3). Оно также вступает в реакцию с небольшой популяцией CD3-положительных Т-клеток, которая опосредует пониженную цитотоксическую активность (2). Это антитело не вступает в реакцию с моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами. Антитело N901 (NKH-1) было отнесено к кластеру дифференцирования CD56 на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD56-PC7 +	12	12,4	0,6	5,2

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((NKH-1)) и клетки отрицательной линии ((NK YT)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD56-PC7	Y = 0,8426 X + 5,3097	0,9631

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-APC

REF A21693 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD20, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. A12693.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A12693.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD20-APC+	50	7,37	3,17	43

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD20-APC +	12	11,75	0,36	3,10

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAJI)) и клетки отрицательной линии ((red blood cells)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD20-APC	Y = 1,01 X + 1,05	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификация компонента 1		Спецификация компонента 2	Спецификация компонента 3
Специфичность	CD14	CD16	CD85k (ILT3)	CD33
Клон	RMO52	3G8	ZM3.8	D3HL60.251
Гибридома	SP2/0 x balb/c		Ag8.653 x balb/c	NS1 x balb/c
Иммуноген	Моноциты + нейтрофилы человека		Фьюжн-белок антигена ILT3 человека	HL60 human cell line
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь		Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография		Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)		R Фикоэритрин (PE)	R-Фикоэритрин-цианин 5.1 (ФЦ5) Молярная
концентрация	FITC / Ig: 6,5 - 10	FITC / Ig: 3,5 - 7,5	PE / Ig: 0.5 - 1.5	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nM		488 nM	488 nM
Пик эмиссии	525 nm		575 nm	670 nm
Буфер	Фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH 7,2, содержащий бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл и 0,1% NaN_3			

CD(14+16)-FITC

CD85k (ILT3)-PE
CD33-PC5

REF A23413 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она предназначена для идентификации и подсчета миелоидной субпопуляции циркулирующих дендритных клеток (MDC) в биологических образцах человека.

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 цитофлуориметр измеряет светорассеивание и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на диаграмме (описание предложенной стратегии гейтирования на примерах изложено в Приложении).

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Одновременный анализ антигенов CD14, CD16, CD85k (ILT3) и CD33 позволяет идентифицировать и охарактеризовать миелоидные дендритные клетки (MDC) периферической крови. В начале проводят гейтирование всех миелоидных клеток с помощью CD33 и выделяют положительную по ILT3 популяцию MDC + моноциты. Различить популяцию MDC и субпопуляции моноцитов удается с помощью комбинации антител CD14 + CD16. В недавних исследованиях было показано снижение количественного содержания и иногда даже нарушения функциональной активности циркулирующих подтипов плазмацитоидных и/или миелоидных дендритных клеток при различных заболеваниях.

Было показано снижение количества циркулирующих DC при хроническом гепатите B (1) и C (2) по сравнению с пациентами из контрольной группы и пациентами с острым гепатитом.

У больных с онкогематологическими заболеваниями количество дендритных клеток также может быть значительно снижено (при лимфобластных или миелобластных лейкозах) (3,4). Подобное наблюдение имеется в отношении и некоторых солидных новообразований (5). Более того, количество циркулирующих дендритных клеток снижено при метастазирующих новообразованиях по сравнению с локализованными опухолями (6).

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

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

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

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 24часов после венепункции.

Замечание: для получения оптимальных результатов необходимо проанализировать готовые образцы в течение 6 часов после иммунного окрашивания.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 10, 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: реагенты IOTest IgG1-PC5 (каталожный номер A07798) и IgG1-FITC/IgG1-PE (каталожный номер A07794).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M 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 (IgG1-PC5 (каталожный номер A07798) и IgG1-FITC/IgG1-PE (каталожный номер A07794)).

каждую из пробирок для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл специфических конъюгатов антител IOTest, а в пробирку для анализа контролей - 20 мкл IgG1-FITC/IgG1-PE и 10 мкл IgG1-PC5.

В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.

Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.

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.

Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.

Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Повторяют этап 5.

Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

0,5 мл или 1 мл ФСБ, содержащего 0,1% формальдегида, если препараты предполагается хранить в течение 2 – 6 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.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

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 использовались образцы крови 31 здорового взрослого донора. В следующей таблице представлено среднее процентное содержание MDC среди МКПК (мононуклеарных клеток периферической крови):

MDC	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
$CD14^{-}/CD16^{-}$ $CD33^{+}$ $CD85k^{+}$	31	0,454	0,148	32,62

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарного ряда. Она интенсивно экспрессирована на моноцитах, макрофагах и слабо на нейтрофилах (7,8). Она также присутствует на плевральных фагоцитарных клетках и на ретикулярных дендритных клетках, на клетках Лангерганса и гистиоцитах (9,10). Моноклональные антитела RMO52 не взаимодействуют с Т- или В-лимфоцитами (7,8).

На шестой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (6th HLDA Workshop), проходившей в Кобе, Япония, в 1996 г., было подтверждено, что моноклональные антитела RMO52 направлены против CD14 (WS Code: MA62, Section M) (11).

Антиген CD16 является низкоаффинным рецептором для IgG (FcgammaRIII). Антиген CD16 существует в двух разных формах, кодируемых двумя разными генами: FcgammaRIIIA (или III-2) и FcgammaRIIIB (или III-1). Первая форма (FcgammaRIIIA) является трансмембранной и экспрессируется на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Вторая форма (FcgammaRIIIB) является ассоциированной с гликозил-фосфатидил-инозитолом (ГФИ) и экспрессируется только на нейтрофилах (12,13).

Моноклональные антитела 3G8 связываются с FcgammaRIIIA, а также (сильно) с FcgammaRIIIB. 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) (14).

CD85k, или ILT3, принадлежит к семейству генов, расположенных на 19-й хромосоме человека. Белки гена ILT относятся к иммуноглобулиноподобным транскриптам (ILT) и известны под названием лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LIR) и моноцитарных/ макрофагальных иммуноглобулиноподобных рецепторов (MIR) (15,16,17). ILT/LIR/MIR экспрессируются преимущественно на моноцитах, макрофагах, дендритных клетках (ДК) и гранулоцитах.

CD85k, именуемый также ILT3, LIR-5, HM18, представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой 60 кДа, с двумя внеклеточными доменами Ig-SF и тремя цитоплазматическими ITIM. Молекула конститутивно фосфорилирована. Она избирательно экспрессируется моноцитами, макрофагами и ДК (18). Моноклональные антитела ZM3.8 специфичны к антигену ILT3 человека. Они иммунопреципитируют белок моноцитов с молекулярной массой 60 кДа. ILT3 экспрессируется в образцах крови человека субпопуляцией дендритных клеток (18,19,20).

Антиген CD33 представляет собой трансмембранный мономерный гликопротеин с молекулярным весом 67 кДа. Он экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками на колониеобразующих единицах гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов (CFU GEMM) (21). Он также присутствует на предшественниках гранулоцитов и мононуклеарных фагоцитов (CFU GM) и на ранних эритроидных предшественниках (BFU E) (21). Моноклональные антитела D3HL60.251 взаимодействуют с клетками миелоидного ряда, интенсивно с моноцитами и слабо с гранулоцитами периферической крови. Они не взаимодействуют со зрелыми лимфоидными клетками или лимфоидными предшественниками.

На четвертой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (4th HLDA Workshop), проходившей в Вене, Австрия, в 1989 г., было подтверждено, что моноклональные антитела D3HL60.251 направлены против CD33 (WS Code: 504, Section M) (22).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитофлуориметре в одном образце, содержащем положительные клетки (периферической крови одного донора), определялось процентное содержание положительных клеток. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

MDC	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
$CD14^{-}/CD16^{-}$ $CD33^{+}$ $CD85k^{+}$	12	0,567	0,031	5,388

Линейность

Для проверки линейности окрашивания CD33 и CD85k данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии THP1 (CD33+ CD85k+) и клетки отрицательной линии MOLT4 ($CD33^{-}$ $CD85k^{-}$). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CD33	Y = 0,9641 X + 1,6763	0,0998
CD85k	Y = 0,9595 X + 2,0434	0,997

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (23).
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 (24).
7. В связи с тандемной структурой флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик эмиссии различен в разных сериях PC5. Поэтому для целей многоцветного анализа компенсационную матрицу следует тщательно контролировать при смене серии PC5-конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификация компонента 1		Спецификация компонента 2	Спецификация компонента 3
Специфичность	CD14	CD16	CD85k (ILT3)	CD123
Клон	RMO52	3G8	ZM3.8	SSDCLY107D2
Гибридома	SP2/0 x balb/c		Ag8.653 x balb/c	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Моноциты + нейтрофилы человека		Фьюжн-белок антигена ILT3 человека	Плазмацитоидные дендритные клетки человека
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1
Вид	Мышь		Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография		Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)		R Фикоэритрин (PE)	R-Фикоэритрин-цианин 5.1 (ФЦ5) Молярная
концентрация	FITC / Ig: 6,5 - 10	FITC / Ig: 3,5 - 7,5	PE / Ig: 0.5 - 1.5	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nM		488 nM	488 nM
Пик эмиссии	525 nm		575 nm	670 nm
Буфер	Фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH 7,2, содержащий бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл и 0,1% NaN_3			

IOTest

CD14+16-FITC

CD85k-PE
CD123-PC5

REF A23416 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данная смесь антител, конъюгированных с флуорохромом, предназначена для выполнения многопараметрического анализа методом проточной цитометрии. Она предназначена для идентификации и подсчета плазмоцитоидной субпопуляции циркулирующих дендритных клеток (PDC) в биологических образцах человека.

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 цитофлуориметр измеряет светорассеивание и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на диаграмме (описание предложенной стратегии гейтирования на примерах изложено в Приложении).

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Одновременный анализ антигенов CD14, CD16, CD85k (ILT3) и CD123 позволяет идентифицировать и охарактеризовать плазмацитоидные дендритные клетки периферической крови (PDC), при этом вначале выбираются клетки, экспрессирующие CD123 (базофилы, PDC, некоторые моноциты), а затем с помощью ILT3 проводится положительная селекция популяции PDC + моноциты. Окончательное отделение PDC от субпопуляции моноцитов проводится с помощью комбинации CD14+ CD16.

В недавних исследованиях было показано снижение количественного содержания и иногда даже нарушения функциональной активности циркулирующих субпопуляций плазмацитоидных и/или миелоидных дендритных клеток при различных заболеваниях.

Поскольку PDC секретируют высокие количества IFN-альфа, предполагается, что они играют важную роль в патогенезе вирусных инфекций и системной красной волчанки (1). Было показано снижение количества циркулирующих PDC при хроническом гепатите B (2) и C (3) по сравнению с пациентами из контрольной группы и пациентами с острым гепатитом.

Более того, уровень циркулирующих дендритных клеток имеет тенденцию к снижению у больных СПИД и онкологическими заболеваниями. Интересно отметить, что в одном исследовании у больных СПИД при проведении трехкомпонентной терапии отмечалось снижение вирусной нагрузки, коррелирующее с увеличением количества циркулирующих PDC (4).

У больных с онкогематологическими заболеваниями количество дендритных клеток также может быть значительно снижено (при лимфобластных или миелобластных лейкозах) (5,6). Подобное наблюдение имеется в отношении и некоторых солидных новообразований (7). Более того, количество циркулирующих дендритных клеток снижено при метастазирующих новообразованиях по сравнению с локализованными опухолями (8).

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

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

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

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

Замечание: для получения оптимальных результатов необходимо проанализировать готовые образцы в течение 6 часов после иммунного окрашивания.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 10, 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: реагенты IOTest IgG1-PC5 (каталожный номер A07798) и IgG1-FITC/IgG1-PE (каталожный номер A07794).
- 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 (IgG1-PC5 (каталожный номер A07798) и IgG1-FITC/IgG1-PE (каталожный номер A07794)).

каждую из пробирок для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл специфических конъюгатов антител IOTest, а в пробирку для анализа контролей - 20 мкл IgG1-FITC/IgG1-PE и 10 мкл IgG1-PC5.

В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.

Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.

Удаляют супернатант аспирацией.

Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Повторяют этап 5.

Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

0,5 мл или 1 мл ФСБ, содержащего 0,1% формальдегида, если препараты предполагается хранить в течение 2 – 6 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.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

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 использовались образцы крови 30 здоровых взрослых доноров. В следующей таблице представлено среднее процентное содержание PDC среди МКПК (мононуклеарных клеток периферической крови):

PDC	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
$CD14^{-}CD16^{-}$ + $CD123^{+}$ $CD85k^{+}$	30	0,495	0,203	40,99

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарного ряда. Она интенсивно экспрессирована на моноцитах, макрофагах и слабо на нейтрофилах (9,10). Она также присутствует на плевральных фагоцитарных клетках и на ретикулярных дендритных клетках, на клетках Лангерганса и гистиоцитах (11,12). Моноклональные антитела RMO52 не взаимодействуют с Т- или В-лимфоцитами (9,10).

На шестой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов (6th HLDA Workshop), проходившей в Кобе, Япония, в 1996 г., было подтверждено, что моноклональные антитела RMO52 направлены против CD14 (WS Code: MA62, Section M) (13).

Антиген CD16 является низкоаффинным рецептором для IgG (FcgammaRIII). Антиген CD16 существует в двух разных формах, кодируемых двумя разными генами: FcgammaRIIIA (или III-2) и FcgammaRIIIB (или III-1). Первая форма (FcgammaRIIIA) является трансмембранной и экспрессируется на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Вторая форма (FcgammaRIIIB) является ассоциированной с гликозил-фосфатидил-инозитолом (ГФИ) и экспрессируется только на нейтрофилах (14,15).

Моноклональные антитела 3G8 связываются с FcgammaRIIIA, а также (сильно) с FcgammaRIIIB. 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) (16).

CD85k, или ILT3, принадлежит к семейству генов, расположенных на 19-й хромосоме человека. Белки гена ILT относятся к иммуноглобулиноподобным транскриптам (ILT) и известны под названием лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LIR) и моноцитарных/ макрофагальных иммуноглобулиноподобных рецепторов (MIR) (17,18,19). ILT/LIR/MIR экспрессируются преимущественно на моноцитах, макрофагах, дендритных клетках (ДК) и гранулоцитах.

CD85k, именуемый также ILT3, LIR-5, HM18, представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой 60 кДа, с двумя внеклеточными доменами Ig-SF и тремя цитоплазматическими ITIM. Молекула конститутивно фосфорилирована. Она избирательно экспрессируется моноцитами, макрофагами и ДК (20). Моноклональные антитела ZM3.8 специфичны к антигену ILT3 человека. Они иммунопреципитируют белок моноцитов с молекулярной массой 60 кДа. ILT3 экспрессируется в образцах крови человека субпопуляцией дендритных клеток (20,21,22).

Антиген CD123, или альфа-рецептор интерлейкина 3, принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов (23,24). Он конститутивно экспрессируется коммитированными гемопоэтическими стволовыми клетками/клетками-предшественниками, большинством клеток миелоидного ряда ($CD13^{+}$, $CD14^{+}$, $CD33^{+}$, $CD15^{low}$) и некоторыми $CD19^{+}$ клетками (25); он отсутствует на $CD3^{+}$ клетках (25). Моноклональные антитела SSDCLY107D2 взаимодействуют с молекулой CD123, присутствующей на PDC (23).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

PDC	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
$CD14^{-}CD16^{-}$ + $CD123^{+}$ $CD85k^{+}$	12	0,283	0,018	6,20

Линейность

Для проверки линейности окрашивания CD123 и CD85k данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии (PDC, выделенные из нормальной цельной крови) и клетки отрицательной линии MOLT4 ($CD123^{-}$ $CD85k^{-}$). Общее количество клеток в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0,02% до 0,15%. Это соответствует концентрациям от нормальной до в десять раз меньше нормальной величины.

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
$CD123^+CD85k^+$	Y = 1,0201 X - 0,0012	0,9953

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
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 (27).
7. В связи с тандемной структурой флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик эмиссии различен в разных сериях PC5. Поэтому для целей многоцветного анализа компенсационную матрицу следует тщательно контролировать при смене серии PC5-конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD138
Клон	B-A38
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	U266 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD138-PE

REF A54190 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD138, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD138 ассоциирован с поздней стадией дифференциации B-клеток (плазматических клеток). CD138 не экспрессируется в созревающих/зрелых B-клетках. CD138 рассматривается как идентифицирующий признак для обнаружения плазматических клеток методом проточной цитометрии (1,2). CD138, в сочетании с другими CD, например, CD38, CD45, CD19, CD56, CD20, CD28, CD117, широко используется для идентификации заболеваний, связанных с плазматическими клетками, включая множественную миелому, моноклональную гаммапатию неустановленного значения (MGUS) и более редко плазмоклеточный лейкоз (3,4,5,6).

Описано, что CD138 присутствует в определенным неходжкинских лимфомах и кератоакантомах, его экспрессия обратно коррелирует с агрессивностью опухоли и ее способностью к инвазии (7,8). Недавно была описана целевая терапия путем образования белка слияния IFNα2, нацеленного на клетки, экспрессирующие CD138, с тем ожиданием, что IFN ингибирует пролиферацию и вызовеьт апоптоз первичных клеток у пациентов с множественной миеломой (MM) (9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD138-PE+	10	0,52	0,26	49

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD138-PE+	10	1,02	0,72	70,33

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD138-PE+	10	0,19	0,33	172,03

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD138 — синдекан-1 гепарансульфатпротеогликан с очень консервативным трансмембранным и цитоплазматическим доменом I типа и внеклеточным доменом различного размера, содержащим ковалентно связанные цепи гепарин сульфата. Синдекан играет роль в контроле роста, распространении клеток, клеточном распознавании, клеточной адгезии и сигнализации, возможно, в качестве ко-рецепторов с интегринами и молекулами межклеточной адгезии для регулирования клеточной сигнализации и организации цитоскелета (10,11).

Моноклональное антитело B-A38 изучалось во время 8th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (8-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Adelaide, Australia, в 2004 г. (12).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD138-PE+	12	55,00	1,55	2,82

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((U266)) и клетки отрицательной линии ((RPMI8866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD138-PE	Y = 0,969 X + 1,09	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD138
Клон	B-A38
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	U266 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD138-PC5

REF A54191 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD138, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD138 ассоциирован с поздней стадией дифференциации B-клеток (плазматических клеток). CD138 не экспрессируется в созревающих/зрелых B-клетках. CD138 рассматривается как идентифицирующий признак для обнаружения плазматических клеток методом проточной цитометрии (1,2). CD138, в сочетании с другими CD, например, CD38, CD45, CD19, CD56, CD20, CD28, CD117, широко используется для идентификации заболеваний, связанных с плазматическими клетками, включая множественную миелому, моноклональную гаммапатию неустановленного значения (MGUS) и более редко плазмоклеточный лейкоз (3,4,5,6).

Описано, что CD138 присутствует в определенным неходжкинских лимфомах и кератоакантомах, его экспрессия обратно коррелирует с агрессивностью опухоли и ее способностью к инвазии (7,8). Недавно была описана целевая терапия путем образования белка слияния IFNα2, нацеленного на клетки, экспрессирующие CD138, с тем ожиданием, что IFN ингибирует пролиферацию и вызовеьт апоптоз первичных клеток у пациентов с множественной миеломой (MM) (9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD138-PC5+	10	0,54	0,69	129,06

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD138-PC5+	10	0,14	0,11	76,78

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD138-PC5+	10	0,019	0,017	87,54

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD138 — синдекан-1 гепарансульфатпротеогликан с очень консервативным трансмембранным и цитоплазматическим доменом I типа и внеклеточным доменом различного размера, содержащим ковалентно связанные цепи гепарин сульфата. Синдекан играет роль в контроле роста, распространении клеток, клеточном распознавании, клеточной адгезии и сигнализации, возможно, в качестве ко-рецепторов с интегринами и молекулами межклеточной адгезии для регулирования клеточной сигнализации и организации цитоскелета (10,11).

Моноклональное антитело B-A38 изучалось во время 8th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (8-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Adelaide, Australia, в 2004 г. (12).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD138-PC5 +	12	54,73	0,95	1,73

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((U266)) и клетки отрицательной линии ((RPMI8866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD138-PC5	Y = 0,9616 X + 1,43	0,998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest Conjugated Antibody IgG1(mouse) -PC5.5

REF A62833 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-PC5,5 , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с PC5,5 , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с R-фикоэритрин-цианином 5.5 (PC5.5), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с PC5,5 , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -PC5,5 (Ref.) адаптирован для использования с PC5,5 -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1	12	99,75	0,04	0,04
Моноциты IgG1	12	99,95	0,04	0,04
Гранулоциты IgG1	12	99,97	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-PC5.5

REF A62835 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A62833.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PC5,5+	10	98,26	0,90	0,91

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-PC5,5 +	12	99,93	0,03	0,03
Моноциты + CD45-PC5,5	12	99,91	0,06	0,06
Гранулоциты + CD45-PC5,5	12	99,99	0,01	0,01

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, Цельная кровь была концентрирована, после чего была приготовлена серия двукратных разведений для получения образцов, содержащих положительные клетки в количестве от 22 до 16781 на одно исследование. Приготовленные образцы окрашивали в соответствии с вышеописанной процедурой и вычисляли параметры линейной регрессии между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями.

Специфичность	**Линейность (R2)**
Лимфоциты + CD45-PC5,5	0,96

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).
8. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific-Blue / Ig: 5,60 - 7,00
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-Pacific Blue

REF A74763 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific-Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A74764.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-Pacific-Blue+	10	99,62	0,30	0,30

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-Pacific-Blue+	10	99,88	0,18	0,18

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-Pacific-Blue+	10	99,77	0,13	0,13

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-Pacific-Blue +	12	99,31	0,22	0,23
Моноциты + CD45-Pacific-Blue	12	99,65	0,20	0,20
Гранулоциты + CD45-Pacific-Blue	12	99,68	0,17	0,17

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, Цельная кровь была концентрирована, после чего была приготовлена серия двукратных разведений для получения образцов, содержащих положительные клетки в количестве от 40 до 32216 на одно исследование. Приготовленные образцы окрашивали в соответствии с вышеописанной процедурой и вычисляли параметры линейной регрессии между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями.

Специфичность	**Линейность (R2)**
Лимфоциты + CD45-Pacific-Blue	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1 kappa
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 2,50 - 5,20
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest Conjugated Antibody IgG1(mouse) -Pacific Blue

REF A74764 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-Pacific Blue , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с Pacific Blue , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с Pacific Blue, из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с Pacific Blue , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -Pacific Blue (Ref. A74764) адаптирован для использования с Pacific Blue -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	99,57	0,07	0,07
Моноциты IgG1 -	12	98,99	0,22	0,23
Гранулоциты IgG1 -	12	97,70	0,11	0,11

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-APC
-Alexa Fluor 700

REF A79390 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A79391.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-APC-Alexa Fluor 700 +	10	99,73	0,25	0,25

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-APC-Alexa Fluor 700 +	10	99,69	0,28	0,28

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-APC-Alexa Fluor 700 +	10	99,89	0,06	0,06

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Lymphocytes CD45-APC-Alexa Fluor 700 +	12	98,89	0,45	0,45
Monocytes CD45-APC-Alexa Fluor 700 +	12	99,72	0,14	0,14
Granulocytes CD45-APC-Alexa Fluor 700 +	12	99,96	0,02	0,02

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, Цельная кровь была концентрирована, после чего была приготовлена серия двукратных разведений для получения образцов, содержащих положительные клетки в количестве от 69 до 149789 на одно исследование. Приготовленные образцы окрашивали в соответствии с вышеописанной процедурой и вычисляли параметры линейной регрессии между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями.

Специфичность	**Линейность (R2)**
Lymphocytes CD45-APC-Alexa Fluor 700 +	1,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).
8. На субпопуляции лимфоцитов может происходить слабое неспецифичное связывание некоторых доноров с конъюгатами APC-Alexa Fluor 700.
9. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-APC
-Alexa Fluor 700

REF A79391 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-APC-AlexaFluor700 , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с APC-AlexaFluor700 , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с Аллофикоцианином-Alexa Fluor 700 (APC-Alexa Fluor 700), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с APC-AlexaFluor700 , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -APC-AlexaFluor700 (Ref. A79391) адаптирован для использования с APC-AlexaFluor700 -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1	12	99,07	0,11	0,11
Моноциты IgG1	12	98,68	0,38	0,39
Гранулоциты IgG1	12	99,90	0,04	0,04

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.
8. На субпопуляции лимфоцитов может происходить слабое неспецифичное связывание некоторых доноров с конъюгатами APC-Alexa Fluor 700.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-APC
-Alexa Fluor 750

REF A79392 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A79393.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-APC-Alexa Fluor 750 +	10	99,38	0,36	0,36

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-APC-Alexa Fluor 750 +	10	99,40	0,40	0,40

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-APC-Alexa Fluor 750 +	10	99,65	0,35	0,35

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Lymphocytes CD45-APC-Alexa Fluor 750 +	12	98,16	0,72	0,73
Monocytes CD45-APC-Alexa Fluor 750 +	12	99,8	0,18	0,18
Granulocytes CD45-APC-Alexa Fluor 750 +	12	99,97	0,01	0,01

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, Цельная кровь была концентрирована, после чего была приготовлена серия двукратных разведений для получения образцов, содержащих положительные клетки в количестве от 132 до 128159 на одно исследование. Приготовленные образцы окрашивали в соответствии с вышеописанной процедурой и вычисляли параметры линейной регрессии между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями.

Специфичность	**Линейность (R2)**
Lymphocytes CD45-APC-Alexa Fluor 750 +	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).
8. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-APC
-Alexa Fluor 750

REF A79393 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-APC-AlexaFluor750 , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с APC-AlexaFluor750 , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с Аллофикоцианином-Alexa Fluor 750 (APC-Alexa Fluor 750), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 183 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с APC-AlexaFluor750 , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -APC-AlexaFluor750 (Ref. A79393) адаптирован для использования с APC-AlexaFluor750 -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Целевые клетки	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1	12	99,98	0,01	0,01
Моноциты IgG1	12	99,98	0,02	0,02
Гранулоциты IgG1	12	99,96	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-APC
-Alexa Fluor 750

REF A94680 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD3, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 365 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A79393.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3-APC-A750+	50	72,2	8,3	11,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3-APC-A750 +	12	74,76	0,52	0,70

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3-APC-A750	Y = 0,9903 X - 0,1702	0,9985

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY 18 lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-APC
-Alexa Fluor 750

REF A94681 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения B-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для B-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев B-клеточных новообразований и моноклонального B-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях B-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую B-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение B-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона B-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с B-клеточным острым лимфобластным лейкозом (B-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов B-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими B-/T-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка B-клеток, а также степени функционального восстановления B-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 365 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A79393.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19+	50	10,7	5,1	47,6

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов В-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов В-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых В-клеток.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD19 +	12	7,91	0,534	6,75

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((FRN3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19	Y = 0,9852 X - 0,3038	0,9967

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody CD4-APC -Alexa Fluor 750

REF A94682 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD4, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот реагент обеспечивает описание клеточных популяций лимфоцитов CD4+ при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие состояния иммунодефицита, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа. Последующее наблюдение и фенотипирование клеточных популяций CD4+ (3) при злокачественных дискразиях крови, таких как лейкемии и лимфомы.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 365 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА С РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A79393.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-APC-A750+	50	44,8	9,1	20,4

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-APC-A750+	50	93,2	3,9	4,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (4). МАт 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD4-APC-A750 +	12	30,25	0,62	2
Моноциты + CD4-APC-A750	12	91,78	0,67	0,7

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((U937)) и клетки отрицательной линии ((RAJI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD4-APC-A750	Y = 0,973 X + 0,5025	0,9996

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human cytotoxic T-lymphocytes clone (HLA A2)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD8-APC
-Alexa Fluor 750

REF A94683 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD8, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Т-клетки CD8+ традиционно классифицируются как Т-лимфоциты Т-клеток/цитотоксические Т-клетки. Анализ популяции лимфоцитов CD8+ с помощью проточной цитометрии является очень эффективным компонентом при определении ранее не исследованных различных функциональных поднаборов памяти, цитотоксических препаратов и функциональных поднаборов эффекторов. Таким образом, оценка CD8 является очень полезной для оценки компетентности Т-клеток и изменяется под воздействием множества факторов иммунодефицита, аутоиммунных состояний и неоплазии, в частности лейкемии, вызываемой Т-клетками, и лимфом.

Кратковременное распространение популяции Т-клеток CD8+ Т обычно происходит на раннем этапе заражения ВИЧ. Считается, что эти популяции роста клеток CD8+ способны содействовать нецитотоксичному подавлению репликации ВИЧ. Постоянное распространение этой популяции наблюдается при двух связанных условиях: синдром диффузного инфильтративного лимфоцитоза (СДИЛ) и связанный с ВИЧ синдром лимфоцитоза CD8+ (1,2). CD8 является маркером Т-клеток, который часто проявляется вместе с CD4 и распознается в большинстве Т-клеточных злокачественных опухолях, например при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и анапластической крупноклеточной лимфоме (3).

Т-клеточный лейкоз взрослых достаточно часто присутствуют в организме не проходящих лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающим фенотипом CD4+. С другой стороны наблюдалось резкое увеличение самопроизвольного распространения опухоли, что преобладает с лимфоцитами CD8+ у пациентов NHIH. Таким образом, размножение клона HTLV-1 положительных лимфоцитов CD8+ и CD4+ происходит с использованием двух разных механизмов. Поэтому инфекция HTLV-1 устанавливает предлейкозный фенотип, который ограничен инфицированными CD4+ клонами (4).

Т-клетки CD8+ Т участвуют в инициации, распространении и регулировании нескольких патогенных аутоиммунных реакций. Аутореактивные Т-клетки CD8+ также могут обеспечивать аутоиммунитет, секретируя цитокины, способные повышать восприимчивость целевых клеток к цитотоксичности, или секретируя хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в область аутоиммунитета. Кроме того, было выявлено, что аутореактивные Т-клетки CD8+ уменьшают аутоиммунные реакции. Т-клетки CD8+ участвуют в патогенезе не менее чем 30 аутоиммунных нозологических единиц в основном за счет цитотоксического воздействия на различные целевые клетки (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A79393.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD8+	50	35,6	8,5	24

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD8 является димером с дисульфидной связью, который существует либо в виде гомодимера CD8α, либо в виде гетеродимера CD8αβ. CD8β необходим для поверхностной экспрессии CD8α. Молекулярный вес каждого мономера α и β составляет примерно 32–34 kDa (6, 7). CD8 связывается с неполиморфным доменом (α3-доменом) молекул MHC класса I (8). Молекула CD8 присутствует в поднаборе Т-клеток лимфоцитов периферийной крови человека. Поднабор NK-клеток экспрессирует антиген CD8, но с малой и средней плотностью экспрессии (9).

Гомодимер CD8α экспрессируется NK-клетками и Т-клетками γδ+. CD8 также присутствует в большинстве тимоцитов, где он часто коэкспрессирует с CD4, а также в субпопуляции костномозговых клеток. Молекула CD8 взаимодействует с рецептором Т-клетки (TCR) в качестве корецептора для антигенраспознающей клетки, ограниченной MHC класса I (10, 11). CD8 широко используется как маркер цитотоксических Т-лимфоцитов.

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (12).

B9.11 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD8 на первом International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека), который проводился в Paris, Франция, в 1982 г. (13, 14)

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD8 +	12	35,12	0,81	2,3

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD8	Y = 0,9773 X + 0,4946	0,9966

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	PerFix-nc буферный раствор 1	PerFix-nc буферный раствор 2	PerFix-nc буферный раствор 3
	B31164	**B31165**	**B31166**
	Фиксирующий реагент	**Пермеабилизирующий реагент**	**Основной раствор 10-кратной концентрации**
Форма выпуска	Жидкость	Жидкость	Жидкость
Объем	1,9 мл	22,5 мл	26,3 мл
Число флаконов	1 флакон	1 флакон	1 флакон
Объем на одно определение	5 или 25 мкл	300 мкл	300 или 350 мкл

PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit)

REF B31167 75 тестов

Применять только для диагностики *in vitro*,
Для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор PerFix-nc Kit используется в подготовке биологических образцов для анализа методом проточной цитометрии.

Набор PerFix-nc Kit предназначен для одновременного лизиса эритроцитов и пермеабилизации цитоплазматической мембраны лейкоцитов с целью демонстрации внутриклеточных и внеклеточных эпитопов при помощи флуоресцентных зондов.

ПРИНЦИП

Набор PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit) для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию включает два реагента, готовых к использованию, и один реагент, который требует 10-кратного разведения перед использованием. Реагенты набора PerFix-nc Kit используются для пермеабилизации цитоплазматической мембраны лейкоцитов с целью демонстрации внутриклеточных эпитопов при помощи красителей или антител, конъюгированных с флуорохромом. Набор PerFix-nc Kit можно использовать в подготовке биологических образцов для анализа методом проточной цитометрии. Набор предназначен для улучшения отношения сигнал/шум при окрашивании клеток и упрощения работы, необходимой для подготовки образцов. Точное обнаружение внутриклеточных и внеклеточных эпитопов проводится при следующих условиях:

- Отсутствие этапа отмывания в процедуре. Этап окончательного отмывания является необязательным.
- Вместе с внутриклеточными маркерами можно добавить несколько маркеров клеточной поверхности, которые затем одновременно инкубируются на этапе пермеабилизации.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
2. Во время инкубации не подвергайте реагенты воздействию яркого света.
3. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание получения неверных результатов.
4. PerFix-nc буферный раствор 1 (фиксирующий реагент) и буферный раствор 3 (основной раствор 10-кратной концентрации) содержат формальдегид. Формальдегид является токсичным веществом и аллергеном, также формальдегид считается канцерогеном. Соблюдайте осторожность при работе с этим соединением. Работайте с этим соединением в хорошо проветриваемом помещении. Запрещено пипетировать реагенты ртом. Избегайте контакта реагентов с кожей, слизистыми оболочками, глазами и попадания реагентов на одежду (используйте защитные перчатки, очки и халат).
5. PerFix-nc буферный раствор 2 (пермеабилизирующий реагент) содержит ProClin 300. ProClin 300 является потенциально раздражающим соединением. С этим соединением следует работать в хорошо проветриваемом помещении и соблюдать осторожность при работе с ним. Запрещено пипетировать реагенты ртом. Избегайте контакта реагентов с кожей, слизистыми оболочками, глазами и попадания реагентов на одежду (используйте защитные перчатки, очки и халат).
6. Биологическая опасность: все биологические образцы следует рассматривать как потенциально инфекционные. Соблюдайте осторожность при работе с биологическими образцами (используйте защитные перчатки, халат и очки).
7. После завершения работы утилизируйте пробирки с кровью и материалы одноразового использования, соблюдая надлежащие меры предосторожности.
8. Запрещено пипетировать образцы ртом. Избегайте контакта образцов с кожей, слизистыми оболочками и глазами.
9. При работе с буферными растворами PerFix-nc и другими реагентами соблюдайте принципы надлежащей лабораторной практики.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

PerFix-nc Buffer 1, Fixative Reagent ОПАСНО!

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
	H313	Может нанести вред при контакте с кожей
	H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
	H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
	H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
	H350	Может вызвать рак.
	H370	Наносит вред органам.
	P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
	P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
	P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
	P308+P311	При оказании воздействия или обеспокоенности: обратиться к врачу.
	P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.
	P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
		Метанол 1 - 2%
		Формальдегид 4 - 6%
PerFix-nc Buffer 2, Permeabilizing Reagent	ОСТОРОЖНО!	

	H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
	P261	Избегать вдыхания паров.
	P272	Не выносить загрязненную одежду с рабочего места.
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
	P302+P352	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом.
	P333+P313	При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
	P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
PerFix-nc Buffer 3, Final 10X Solution	ОПАСНО!	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
H313	Может нанести вред при контакте с кожей
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
H370	Наносит вред органам.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P308+P311	При оказании воздействия или обеспокоенности: обратиться к врачу.
P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
	Метанол 1 - 2%
	Формальдегид 4 - 6%

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

Буферные растворы PerFix-nc необходимо хранить при температуре от 18 до 25°C.

Стабильность реагентов в невскрытом флаконе: см. срок годности, указанный на этикетке флакона. Не замораживать.

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

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Приготовление реагентов PerFix-nc буферный раствор 1 и 2

Разведение не требуется. Оба реагента можно использовать непосредственно из флакона.

Приготовление реагента PerFix-nc буферный раствор 3

Приготовьте рабочий раствор 1-кратной концентрации непосредственно перед его использованием. Разведите PerFix-nc буферный раствор 3, имеющий 10-кратную концентрацию (основной раствор 10-кратной концентрации), в деионизированной воде следующим образом: добавьте 1 объем буферного раствора 3 к 9 объемам воды. Хорошо перемешайте перед использованием. Приготовьте рабочий раствора реагента 1-кратной концентрации только в том объеме, который требуется для работы в течение дня.

ПРОБЫ

Образцы венозной крови необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта соль ЭДТА или ACD, или гепарин.

Анализируйте образцы венозной крови в течение 24 часов после венепункции.

Образцы костного мозга необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Анализируйте образцы костного мозга в течение 48 часов после их отбора.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Микропипетки для измерения объемов жидкости от 1 до 1 000 мкл.
- Пластмассовые пробирки объемом 5 мл.
- Таймер.
- Перемешивающее устройство (типа «Вортекс»).
- Антитела к внутриклеточным эпитопам и молекулам на поверхности, конъюгированные с флуорохромом.
- Центрифуга с регулируемой скоростью (если используется этап отмывания).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

ПРОЦЕДУРА

Допускается использовать фиксирующий раствор двух концентраций в зависимости от внутриклеточных эпитопов. Фактически для некоторых эпитопов самая низкая концентрация фиксирующего раствора (5 мкл фиксирующего реагента) является недостаточной для удержания молекул внутри клетки (это является верным, в частности, для растворимых антигенов небольшого размера). В этом случае обратитесь к разделу B. Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента.

ПРИМЕЧАНИЕ: набор содержит фиксирующий реагент для процедуры фиксации с использованием высокой концентрации реагента в количестве, достаточном для проведения всех 75 тестов.

Число эритроцитов и лейкоцитов, присутствующих в образце, должно быть менее 6 x 10^6 на мкл (6 x 10^{12}/л) и менее 10^4/мкл (10^{10}/л) соответственно. При необходимости разведите в PBS (натрий-фосфатном буфере), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина.

A. Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента

1. Внесите пипеткой 50 мкл образца крови или костного мозга на дно каждой пробирки с предварительно наклеенной этикеткой. Избегайте попадания образца на стенки пробирки, так как это может привести в неправильной обработке.
2. Внесите пипеткой 5 мкл фиксирующего реагента в каждую пробирку.
3. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Повторно перемешайте зафиксированные образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и добавьте 300 мкл пермеабилизирующего реагента в каждую пробирку. Затем немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс».
5. Немедленно добавьте в каждую пробирку антитела к внутриклеточным эпитопам и молекулам на поверхности, конъюгированные с флуорохромом.
6. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 – 30 минут при комнатной температуре.
7. Добавьте 3 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации (приготовленного из основного раствора 10-кратной концентрации) в каждую пробирку. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс». Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).
8. Необязательный окончательный этап отмывания: в конце процедуры можно выполнить дополнительное центрифугирование, которое обеспечит концентрирование клеток для более быстрого анализа на проточном цитометре и в итоге улучшит отношение сигнал/шум. Осадите центрифугированием клетки при скорости 500 g в течение 5 минут и повторно суспензируйте клетки в 0,5 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации. Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).

B. Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента

1. Внесите пипеткой 50 мкл образца крови или костного мозга на дно каждой пробирки с предварительно наклеенной этикеткой. Избегайте попадания образца на стенки пробирки, так как это может привести в неправильной обработке.
2. Внесите пипеткой 25 мкл фиксирующего реагента в каждую пробирку.
3. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Повторно перемешайте зафиксированные образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и добавьте 300 мкл пермеабилизирующего реагента в каждую пробирку. Затем немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс».
5. Немедленно добавьте в каждую пробирку антитела к внутриклеточным эпитопам и молекулам на поверхности, конъюгированные с флуорохромом.
6. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 – 30 минут при комнатной температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Добавьте 3 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации (приготовленного из основного раствора 10-кратной концентрации) в каждую пробирку. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс». Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).
8. Необязательный окончательный этап отмывания: в конце процедуры можно выполнить дополнительное центрифугирование, которое обеспечит концентрирование клеток для более быстрого анализа на проточном цитометре и в итоге улучшит отношение сигнал/шум. Осадите центрифугированием клетки при скорости 500 g в течение 5 минут и повторно суспензируйте клетки в 0,5 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации. Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).

ПРИМЕЧАНИЕ: см. Инструкции по применению (IFU) реагентов с антителами для информации об оптимальных условиях хранения иммуноокрашенного образца до его анализа на проточном цитометре.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Приведенные ниже рабочие характеристики были получены с использованием комбинации следующих реагентов: MPO-FITC (миелопероксидаза-ФИТЦ), CD79a-PE, CD3-ECD, CD14-Pacific Blue и CD45-Krome Orange (1,2,3,4,5,6). Данные получены на проточном цитометре NAVIOS с программным обеспечением CXP в течение не более 8 часов после иммуноокрашивания.

ТОЧНОСТЬ С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

Для оценки сходимости четырех вышеописанных процедур (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента, с этапом отмывания или без этапа отмывания) использовались наборы PerFix-nc Kit из одной партии. Двенадцать образцов венозной крови, отобранных с ЭДТА, тестировались в десяти повторностях в течение 6 часов после венопункции, с использованием комбинации реагентов, описанной выше. Эти образцы соответствовали различным диапазонам концентрации лейкоцитов (низкая концентрация < 4 000 лейкоцитов/мкл, нормальная концентрация 4 000 – 10 000 лейкоцитов/мкл, высокая концентрация > 10 000 лейкоцитов/мкл, 4 образца для каждого диапазона).

Внутрианалитическая сходимость была подсчитана для каждого маркера и полученные результаты изложены в следующей таблице:

Параметр (%)	Концентра-ция лейкоцитов	Средняя величина (%)	CV (%)
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Моноциты MPO+	Низкая	7,63	2,8
	Нормальное	5,67	4,2
	Высокие	7,12	3,6
Гранулоциты MPO+	Низкая	55,80	1,0
	Нормальное	70,97	1,1
	Высокие	69,47	0,6
Лимфоциты CD79a+	Низкая	11,96	4,8
	Нормальное	15,88	3,9
	Высокие	15,32	4,5
Лимфоциты CD3+	Низкая	74,09	1,1
	Нормальное	74,36	0,8
	Высокие	68,45	0,9
Моноциты CD45+	Низкая	7,72	3,1
	Нормальное	5,67	3,7
	Высокие	7,29	2,8
Гранулоциты CD45+	Низкая	56,82	0,9
	Нормальное	72,44	1,1
	Высокие	70,22	0,7
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Моноциты MPO+	Низкая	8,05	3,6
	Нормальное	5,32	4,9
	Высокие	6,46	5,1
Гранулоциты MPO+	Низкая	57,25	0,9
	Нормальное	72,73	0,9
	Высокие	70,27	1,3
Лимфоциты CD79a+	Низкая	12,08	4,3
	Нормальное	16,07	4,2
	Высокие	14,92	5,2
Лимфоциты CD3+	Низкая	73,89	0,9
	Нормальное	73,92	0,9
	Высокие	68,96	1,1
Моноциты CD45+	Низкая	8,07	3,9
	Нормальное	5,45	4,3
	Высокие	6,88	2,8
Гранулоциты CD45+	Низкая	57,85	1,0

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
	Нормальное	73,56	0,7
	Высокие	71,63	1,0

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Моноциты MPO+	Низкая	7,68	4,2
	Нормальное	5,79	8,2
	Высокие	7,24	3,2
Гранулоциты MPO+	Низкая	55,21	1,0
	Нормальное	70,95	2,4
	Высокие	68,23	0,7
Лимфоциты CD79a+	Низкая	12,23	5,0
	Нормальное	16,45	6,4
	Высокие	15,62	3,6
Лимфоциты CD3+	Низкая	75,96	1,0
	Нормальное	76,23	1,4
	Высокие	69,76	1,1
Моноциты CD45+	Низкая	8,43	4,3
	Нормальное	5,92	7,1
	Высокие	7,27	2,9
Гранулоциты CD45+	Низкая	57,37	0,9
	Нормальное	72,45	2,4
	Высокие	70,40	0,7

Параметр (%)	**Концентра-ция лейкоцитов**	**Средняя величина (%)**	**CV (%)**
Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Моноциты MPO+	Низкая	8,23	3,7
	Нормальное	5,62	3,7
	Высокие	7,37	4,0
Гранулоциты MPO+	Низкая	56,84	1,6
	Нормальное	72,52	0,5
	Высокие	69,76	1,0
Лимфоциты CD79a+	Низкая	11,85	5,4
	Нормальное	16,25	3,6
	Высокие	14,75	4,3
Лимфоциты CD3+	Низкая	76,09	0,9
	Нормальное	76,37	1,0
	Высокие	70,98	1,0
Моноциты CD45+	Низкая	8,60	4,6
	Нормальное	5,69	3,8
	Высокие	7,44	4,2
Гранулоциты CD45+	Низкая	57,59	1,5
	Нормальное	74,06	0,6
	Высокие	71,76	1,1

Внутрианалитическая сходимость также была подсчитана для восстановления лимфоцитов и чистоты лимфоцитов с использованием CD45-Krome Orange и CD14-Pacific Blue.

Параметр (%)	**Концентра-ция лейкоцитов**	**Средняя величина (%)**	**CV (%)**
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	96,92	0,3
	Нормальное	97,37	0,4
	Высокие	96,18	1,0
Чистота лимфоцитов	Низкая	95,86	1,7
	Нормальное	94,94	2,1
	Высокие	92,33	3,6

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	98,70	0,3
	Нормальное	98,63	0,2
	Высокие	98,60	0,4
Чистота лимфоцитов	Низкая	94,56	3,2
	Нормальное	95,86	2,1
	Высокие	91,08	3,9

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	96,20	0,3
	Нормальное	97,24	0,5
	Высокие	95,34	0,4
Чистота лимфоцитов	Низкая	92,92	1,4
	Нормальное	89,35	2,5
	Высокие	90,37	2,5

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	97,69	0,3
	Нормальное	97,59	0,2
	Высокие	96,30	0,7
Чистота лимфоцитов	Низкая	89,97	1,9
	Нормальное	88,40	1,3
	Высокие	83,09	4,7

СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕТОДОВ

Проведена оценка эквивалентности использования 4 различных протоколов PerFix-nc (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента, с этапом отмывания или без этапа отмывания) или пермеабилизирующего реагента IntraPrep. Пятьдесят образцов венозной крови с 3 диапазонами концентрации лейкоцитов были отобраны в пробирки с тремя антикоагулянтами. Образцы были окрашены в течение 6 часов после венопункции в двух повторностях при помощи реагентов MPO-FITC, CD79a-PE, CD3-ECD, CD14-Pacific Blue и CD45-Krome Orange (1,2,3,4,5,6). Данные анализировались в соответствии с CLSI EP9-A2, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient samples (7). Полученные результаты приведены в следующей таблице:

Параметр (%)	Число образцов	Систе-мати-ческая ошиб-ка	Lower Limit (Нижний предел)	Upper Limit (Верхний предел)
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO$^+$	50	0,68	0,189	1,173
Гранулоциты MPO+	50	-2,10	-2,754	-1,451
Лимфоциты CD79a+	50	0,36	-0,046	0,765
Лимфоциты CD3+	50	-0,28	-0,958	0,401
Моноциты CD45+	50	0,28	-0,254	0,819
Гранулоциты CD45+	50	-2,54	-3,006	-2,069

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Моноциты MPO$^+$	50	0,23	-0,160	0,614
Гранулоциты MPO+	50	-0,78	-1,487	-0,069
Лимфоциты CD79a+	50	0,50	0,090	0,906
Лимфоциты CD3+	50	-0,22	-0,871	0,432
Моноциты CD45+	50	-0,36	-0,787	0,067
Гранулоциты CD45+	50	-1,16	-1,685	-0,626

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,71	0,285	1,127
Гранулоциты MPO+	50	-2,63	-3,448	-1,803
Лимфоциты CD79a+	50	0,59	0,211	0,961
Лимфоциты CD3+	50	1,22	0,413	2,033
Моноциты CD45+	50	0,45	-0,025	0,921
Гранулоциты CD45+	50	-2,67	-3,353	-1,989

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,52	0,131	0,899
Гранулоциты MPO+	50	-0,91	-1,619	-0,209
Лимфоциты CD79a+	50	0,41	0,053	0,766
Лимфоциты CD3+	50	1,63	0,946	2,318
Моноциты CD45+	50	0,12	-0,312	0,555
Гранулоциты CD45+	50	-0,88	-1,332	-0,419

Также была проведена оценка эквивалентности использования 4 различных протоколов PerFix-nc (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента, с этапом отмывания или без этапа отмывания) или пермеабилизирующего реагента IntraPrep на 50 образцах костного мозга, отобранных с ЭДТА и протестированных в течение 6 часов после отбора, при тех же условиях, что описаны выше. Полученные результаты приведены в следующей таблице:

Параметр (%)	**Число образцов**	**Систе-мати-ческая ошиб-ка**	**Lower Limit (Нижний предел)**	**Upper Limit (Верхний предел)**
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO+	50	1,00	0,733	1,260
Гранулоциты MPO+	50	-3,49	-4,216	-2,754
Лимфоциты CD79a+	50	0,02	-1,131	1,177
Лимфоциты CD3+	50	-0,58	-1,753	0,602
Моноциты CD45+	50	0,16	-0,100	0,416
Гранулоциты CD45+	50	-2,43	-3,649	-1,217

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,73	0,487	0,973
Гранулоциты MPO+	50	-1,76	-2,389	-1,122
Лимфоциты CD79a+	50	-0,47	-1,631	0,686
Лимфоциты CD3+	50	-1,34	-2,507	-0,183
Моноциты CD45+	50	-0,21	-0,462	0,045
Гранулоциты CD45+	50	-1,26	-2,365	-0,164

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,80	0,576	1,019
Гранулоциты MPO+	50	-4,19	-4,956	-3,418
Лимфоциты CD79a+	50	0,34	-0,582	1,264
Лимфоциты CD3+	50	0,37	-0,588	1,333
Моноциты CD45+	50	0,39	0,144	0,627
Гранулоциты CD45+	50	-3,14	-4,237	-2,035

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,71	0,500	0,929
Гранулоциты MPO+	50	-1,82	-2,438	-1,210
Лимфоциты CD79a+	50	0,03	-0,842	0,908
Лимфоциты CD3+	50	-0,15	-1,016	0,723
Моноциты CD45+	50	-0,08	-0,348	0,182
Гранулоциты CD45+	50	-1,22	-2,322	-0,113

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитометра, неверной компенсации флуоресценции и неправильной настройке регионов могут быть получены ошибочные результаты.
2. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать приведенную Инструкцию по применению и следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
3. Для оптимальных результатов следует титровать все конъюгированные антитела, используемые для внутриклеточного и внеклеточного окрашивания. Рекомендуется титровать новые антитела параллельно с двумя процедурами (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента) и выбрать оптимальные условия.
4. Для некоторых маркеров клеточной поверхности даже относительно низкая концентрация фиксирующего реагента PerFix-nc может негативно влиять на эпитопы клеточной поверхности. В этом случае рекомендуется использовать другой клон антитела или другой маркер (если возможно), или добавить подвергаемые негативному воздействию антитела в образец до этапа фиксации и выполнить предварительную инкубацию с образцом в соответствии с рекомендуемым временем инкубации.
5. В некоторых образцах костного мозга эритробласты могут проявлять устойчивость к лизису и отображаться на гистограмме дифракции света в той же области, что и лейкоциты.
6. Если возможно, целесообразно (и рекомендуется) сгруппировать тесты в несколько серий:

- При проведении нескольких исследований на одном образце крови выполните фиксацию всего имеющегося объема крови. Используйте соотношение объема крови и фиксирующего реагента, рекомендованное в процедуре: 5 мкл или 25 мкл фиксирующего реагента на 50 мкл крови. Затем внесите в каждую пробирку 55 мкл или 75 мкл смеси во время инкубации в течение 15 минут (или по истечении 15 минут, если в пробирках уже содержится смесь пермеабилизирующего буферного раствора и антител).

  ПРИМЕЧАНИЕ: для некоторых образцов крови дебрис эритроцитов может вызвать значительные помехи на гистограмме SS/FS (бокового / прямого светорассеяния) при фиксации серии проб в ходе процедуры фиксации с использованием высокой концентрации реагента, с этапом отмывания. Чтобы исключить эти помехи рекомендуется использовать стратегию гейтирования.

- При проведении нескольких исследований на различных образцах с одинаковой смесью антител более эффективно готовить смесь пермеабилизирующего буферного раствора + антител для всей серии проб. В этом случае внесите 300 мкл пермеабилизирующего буферного раствора + антитела в каждую пробирку по истечении 15 минут времени фиксации (или во время фиксации всей серии проб).

7. Красители PerCP могут не подходить оптимально для использования с набором PerFix-nc Kit.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X и Pacific Blue являются торговыми марками компании Molecular Probes, Inc.

ProClin является торговой маркой Rohm and Haas Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	PerFix-nc буферный раствор 1	PerFix-nc буферный раствор 2	PerFix-nc буферный раствор 3
	B31164	**B31165**	**B31166**
	Фиксирующий реагент	**Пермеабилизирующий реагент**	**Основной раствор 10-кратной концентрации**
Форма выпуска	Жидкость	Жидкость	Жидкость
Объем	2 x 1,9 мл	2 x 22,5 мл	2 x 26,3 мл
Число флаконов	2 флакона	2 флакона	2 флакона
Объем на одно определение	5 или 25 мкл	300 мкл	300 или 350 мкл

PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit)

REF B31168 150 тестов

Применять только для диагностики *in vitro*,
Для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор PerFix-nc Kit используется в подготовке биологических образцов для анализа методом проточной цитометрии.

Набор PerFix-nc Kit предназначен для одновременного лизиса эритроцитов и пермеабилизации цитоплазматической мембраны лейкоцитов с целью демонстрации внутриклеточных и внеклеточных эпитопов при помощи флуоресцентных зондов.

ПРИНЦИП

Набор PerFix-nc Kit (no centrifuge assay Kit) для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию включает два реагента, готовых к использованию, и один реагент, который требует 10-кратного разведения перед использованием. Реагенты набора PerFix-nc Kit используются для пермеабилизации цитоплазматической мембраны лейкоцитов с целью демонстрации внутриклеточных эпитопов при помощи красителей или антител, конъюгированных с флуорохромом. Набор PerFix-nc Kit можно использовать в подготовке биологических образцов для анализа методом проточной цитометрии. Набор предназначен для улучшения отношения сигнал/шум при окрашивании клеток и упрощения работы, необходимой для подготовки образцов. Точное обнаружение внутриклеточных и внеклеточных эпитопов проводится при следующих условиях:

- Отсутствие этапа отмывания в процедуре. Этап окончательного отмывания является необязательным.
- Вместе с внутриклеточными маркерами можно добавить несколько маркеров клеточной поверхности, которые затем одновременно инкубируются на этапе пермеабилизации.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
2. Во время инкубации не подвергайте реагенты воздействию яркого света.
3. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание получения неверных результатов.
4. PerFix-nc буферный раствор 1 (фиксирующий реагент) и буферный раствор 3 (основной раствор 10-кратной концентрации) содержат формальдегид. Формальдегид является токсичным веществом и аллергеном, также формальдегид считается канцерогеном. Соблюдайте осторожность при работе с этим соединением. Работайте с этим соединением в хорошо проветриваемом помещении. Запрещено пипетировать реагенты ртом. Избегайте контакта реагентов с кожей, слизистыми оболочками, глазами и попадания реагентов на одежду (используйте защитные перчатки, очки и халат).
5. PerFix-nc буферный раствор 2 (пермеабилизирующий реагент) содержит ProClin 300. ProClin 300 является потенциально раздражающим соединением. С этим соединением следует работать в хорошо проветриваемом помещении и соблюдать осторожность при работе с ним. Запрещено пипетировать реагенты ртом. Избегайте контакта реагентов с кожей, слизистыми оболочками, глазами и попадания реагентов на одежду (используйте защитные перчатки, очки и халат).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Биологическая опасность: все биологические образцы следует рассматривать как потенциально инфекционные. Соблюдайте осторожность при работе с биологическими образцами (используйте защитные перчатки, халат и очки).
7. После завершения работы утилизируйте пробирки с кровью и материалы одноразового использования, соблюдая надлежащие меры предосторожности.
8. Запрещено пипетировать образцы ртом. Избегайте контакта образцов с кожей, слизистыми оболочками и глазами.
9. При работе с буферными растворами PerFix-nc и другими реагентами соблюдайте принципы надлежащей лабораторной практики.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

PerFix-nc Buffer 1, Fixative Reagent — ОПАСНО!

H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
H313	Может нанести вред при контакте с кожей
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
H370	Наносит вред органам.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P308+P311	При оказании воздействия или обеспокоенности: обратиться к врачу.
P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием. Метанол 1 - 2% Формальдегид 4 - 6%
PerFix-nc Buffer 2, Permeabilizing Reagent	ОСТОРОЖНО!	
	H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
	P261	Избегать вдыхания паров.
	P272	Не выносить загрязненную одежду с рабочего места.
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
	P302+P352	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом.
	P333+P313	При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
	P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
PerFix-nc Buffer 3, Final 10X Solution	ОПАСНО!	
	H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
	H313	Может нанести вред при контакте с кожей
	H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
	H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
	H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
	H350	Может вызвать рак.
	H370	Наносит вред органам.
	P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
	P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P308+P311	При оказании воздействия или обеспокоенности: обратиться к врачу.
P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
	Метанол 1 - 2%
	Формальдегид 4 - 6%

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

Буферные растворы PerFix-nc необходимо хранить при температуре от 18 до 25°C.

Стабильность реагентов в невскрытом флаконе: см. срок годности, указанный на этикетке флакона. Не замораживать.

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

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Приготовление реагентов PerFix-nc буферный раствор 1 и 2

Разведение не требуется. Оба реагента можно использовать непосредственно из флакона.

Приготовление реагента PerFix-nc буферный раствор 3

Приготовьте рабочий раствор 1-кратной концентрации непосредственно перед его использованием. Разведите PerFix-nc буферный раствор 3, имеющий 10-кратную концентрацию (основной раствор 10-кратной концентрации), в деионизированной воде следующим образом: добавьте 1 объем буферного раствора 3 к 9 объемам воды. Хорошо перемешайте перед использованием. Приготовьте рабочий раствора реагента 1-кратной концентрации только в том объеме, который требуется для работы в течение дня.

ПРОБЫ

Образцы венозной крови необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта соль ЭДТА или ACD, или гепарин.

Анализируйте образцы венозной крови в течение 24 часов после венепункции.

Образцы костного мозга необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Анализируйте образцы костного мозга в течение 48 часов после их отбора.

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.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Микропипетки для измерения объемов жидкости от 1 до 1 000 мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Пластмассовые пробирки объемом 5 мл.
- Таймер.
- Перемешивающее устройство (типа «Вортекс»).
- Антитела к внутриклеточным эпитопам и молекулам на поверхности, конъюгированные с флуорохромом.
- Центрифуга с регулируемой скоростью (если используется этап отмывания).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Допускается использовать фиксирующий раствор двух концентраций в зависимости от внутриклеточных эпитопов. Фактически для некоторых эпитопов самая низкая концентрация фиксирующего раствора (5 мкл фиксирующего реагента) является недостаточной для удержания молекул внутри клетки (это является верным, в частности, для растворимых антигенов небольшого размера). В этом случае обратитесь к разделу B. Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента.

ПРИМЕЧАНИЕ: набор содержит фиксирующий реагент для процедуры фиксации с использованием высокой концентрации реагента в количестве, достаточном для проведения всех 150 тестов.

Число эритроцитов и лейкоцитов, присутствующих в образце, должно быть менее 6 x 10^6 на мкл (6 x 10^{12}/л) и менее 10^4/мкл (10^{10}/л) соответственно. При необходимости разведите в PBS (натрий-фосфатном буфере), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина.

A. Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента

1. Внесите пипеткой 50 мкл образца крови или костного мозга на дно каждой пробирки с предварительно наклеенной этикеткой. Избегайте попадания образца на стенки пробирки, так как это может привести в неправильной обработке.
2. Внесите пипеткой 5 мкл фиксирующего реагента в каждую пробирку.
3. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Повторно перемешайте зафиксированные образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и добавьте 300 мкл пермеабилизирующего реагента в каждую пробирку. Затем немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс».
5. Немедленно добавьте в каждую пробирку антитела к внутриклеточным эпитопам и молекулам на поверхности, конъюгированные с флуорохромом.
6. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 – 30 минут при комнатной температуре.
7. Добавьте 3 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации (приготовленного из основного раствора 10-кратной концентрации) в каждую пробирку. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс». Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).
8. Необязательный окончательный этап отмывания: в конце процедуры можно выполнить дополнительное центрифугирование, которое обеспечит концентрирование клеток для более быстрого анализа на проточном цитометре и в итоге улучшит отношение сигнал/шум. Осадите центрифугированием клетки при скорости 500 g в течение 5 минут и повторно суспензируйте клетки в 0,5 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации. Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).

B. Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента

1. Внесите пипеткой 50 мкл образца крови или костного мозга на дно каждой пробирки с предварительно наклеенной этикеткой. Избегайте попадания образца на стенки пробирки, так как это может привести в неправильной обработке.
2. Внесите пипеткой 25 мкл фиксирующего реагента в каждую пробирку.
3. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Повторно перемешайте зафиксированные образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и добавьте 300 мкл пермеабилизирующего реагента в каждую пробирку. Затем немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс».
5. Немедленно добавьте в каждую пробирку антитела к внутриклеточным эпитопам и молекулам на поверхности, конъюгированные с флуорохромом.
6. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 – 30 минут при комнатной температуре.
7. Добавьте 3 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации (приготовленного из основного раствора 10-кратной концентрации) в каждую пробирку. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс». Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).
8. Необязательный окончательный этап отмывания: в конце процедуры можно выполнить дополнительное центрифугирование, которое обеспечит концентрирование клеток для более быстрого анализа на проточном цитометре и в итоге улучшит отношение сигнал/шум. Осадите центрифугированием клетки при скорости 500 g в течение 5 минут и повторно суспензируйте клетки в 0,5 мл рабочего раствора реагента 1-кратной концентрации. Образец теперь готов для анализа на проточном цитометре (см. примечание ниже).

ПРИМЕЧАНИЕ: см. Инструкции по применению (IFU) реагентов с антителами для информации об оптимальных условиях хранения иммуноокрашенного образца до его анализа на проточном цитометре.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Приведенные ниже рабочие характеристики были получены с использованием комбинации следующих реагентов: MPO-FITC (миелопероксидаза-ФИТЦ), CD79a-PE, CD3-ECD, CD14-Pacific Blue и CD45-Krome Orange (1,2,3,4,5,6). Данные получены на проточном цитометре NAVIOS с программным обеспечением NAVIOS в течение не более 8 часов после иммуноокрашивания.

ТОЧНОСТЬ

Для оценки сходимости четырех вышеописанных процедур (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента, с этапом отмывания или без этапа отмывания) использовались наборы PerFix-nc Kit из одной партии. Двенадцать образцов венозной крови, отобранных с ЭДТА, тестировались в десяти повторностях в течение 6 часов после венопункции, с использованием комбинации реагентов, описанной выше. Эти образцы соответствовали различным диапазонам концентрации лейкоцитов (низкая концентрация < 4 000 лейкоцитов/мкл, нормальная концентрация 4 000 – 10 000 лейкоцитов/мкл, высокая концентрация > 10 000 лейкоцитов/мкл, 4 образца для каждого диапазона).

Внутрианалитическая сходимость была подсчитана для каждого маркера и полученные результаты изложены в следующей таблице:

Параметр (%)	**Концентра-ция лейкоцитов**	**Средняя величина (%)**	**CV (%)**
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Моноциты MPO$^+$	Низкая	7,63	2,8
	Нормальное	5,67	4,2
	Высокие	7,12	3,6
Гранулоциты MPO+	Низкая	55,80	1,0
	Нормальное	70,97	1,1
	Высокие	69,47	0,6
Лимфоциты CD79a+	Низкая	11,96	4,8
	Нормальное	15,88	3,9
	Высокие	15,32	4,5
Лимфоциты CD3+	Низкая	74,09	1,1
	Нормальное	74,36	0,8
	Высокие	68,45	0,9
Моноциты CD45+	Низкая	7,72	3,1
	Нормальное	5,67	3,7
	Высокие	7,29	2,8
Гранулоциты CD45+	Низкая	56,82	0,9

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Параметр (%)	Концентра-ция лейкоцитов	Средняя величина (%)	CV (%)
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
	Нормальное	72,44	1,1
	Высокие	70,22	0,7

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Моноциты MPO+	Низкая	8,05	3,6
	Нормальное	5,32	4,9
	Высокие	6,46	5,1
Гранулоциты MPO+	Низкая	57,25	0,9
	Нормальное	72,73	0,9
	Высокие	70,27	1,3
Лимфоциты CD79a+	Низкая	12,08	4,3
	Нормальное	16,07	4,2
	Высокие	14,92	5,2
Лимфоциты CD3+	Низкая	73,89	0,9
	Нормальное	73,92	0,9
	Высокие	68,96	1,1
Моноциты CD45+	Низкая	8,07	3,9
	Нормальное	5,45	4,3
	Высокие	6,88	2,8
Гранулоциты CD45+	Низкая	57,85	1,0
	Нормальное	73,56	0,7
	Высокие	71,63	1,0

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Моноциты MPO+	Низкая	7,68	4,2
	Нормальное	5,79	8,2
	Высокие	7,24	3,2
Гранулоциты MPO+	Низкая	55,21	4,0
	Нормальное	70,95	2,4
	Высокие	68,23	0,7
Лимфоциты CD79a+	Низкая	12,23	5,0
	Нормальное	16,45	6,4
	Высокие	15,62	3,6
Лимфоциты CD3+	Низкая	75,96	1,0
	Нормальное	76,23	1,4
	Высокие	69,76	1,1
Моноциты CD45+	Низкая	8,43	4,3
	Нормальное	5,92	7,1
	Высокие	7,27	2,9
Гранулоциты CD45+	Низкая	57,37	0,9
	Нормальное	72,45	2,4
	Высокие	70,40	0,7

Параметр (%)	Концентра-ция лейкоцитов	Средняя величина (%)	CV (%)
Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Моноциты MPO+	Низкая	8,23	3,7
	Нормальное	5,62	3,7
	Высокие	7,37	4,0
Гранулоциты MPO+	Низкая	56,84	1,6

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Параметр (%)	Концентра-ция лейкоцитов	Средняя величина (%)	CV (%)
Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
	Нормальное	72,52	0,5
	Высокие	69,76	1,0
Лимфоциты CD79a+	Низкая	11,85	5,4
	Нормальное	16,25	3,6
	Высокие	14,75	4,3
Лимфоциты CD3+	Низкая	76,09	0,9
	Нормальное	76,37	1,0
	Высокие	70,98	1,0
Моноциты CD45+	Низкая	8,60	4,6
	Нормальное	5,69	3,8
	Высокие	7,44	4,2
Гранулоциты CD45+	Низкая	57,59	1,5
	Нормальное	74,06	0,6
	Высокие	71,76	1,1

Внутрианалитическая сходимость также была подсчитана для восстановления лимфоцитов и чистоты лимфоцитов с использованием CD45-Krome Orange и CD14-Pacific Blue.

Параметр (%)	Концентра-ция лейкоцитов	Средняя величина (%)	CV (%)
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	96,92	0,3
	Нормальное	97,37	0,4
	Высокие	96,18	1,0
Чистота лимфоцитов	Низкая	95,86	1,7
	Нормальное	94,94	2,1
	Высокие	92,33	3,6

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	98,70	0,3
	Нормальное	98,63	0,2
	Высокие	98,60	0,4
Чистота лимфоцитов	Низкая	94,56	3,2
	Нормальное	95,86	2,1
	Высокие	91,08	3,9

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	96,20	0,3
	Нормальное	97,24	0,5
	Высокие	95,34	0,4
Чистота лимфоцитов	Низкая	92,92	1,4
	Нормальное	89,35	2,5
	Высокие	90,37	2,5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания			
Восстановле-ние лимфоцитов	Низкая	97,69	0,3
	Нормальное	97,59	0,2
	Высокие	96,30	0,7
Чистота лимфоцитов	Низкая	89,97	1,9
	Нормальное	88,40	1,3
	Высокие	83,09	4,7

СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕТОДОВ

Проведена оценка эквивалентности использования 4 различных протоколов PerFix-nc (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента, с этапом отмывания или без этапа отмывания) или пермеабилизирующего реагента IntraPrep. Пятьдесят образцов венозной крови с 3 диапазонами концентрации лейкоцитов были отобраны в пробирки с тремя антикоагулянтами. Образцы были окрашены в течение 6 часов после венопункции в двух повторностях при помощи реагентов MPO-FITC, CD79a-PE, CD3-ECD, CD14-Pacific Blue и CD45-Krome Orange (1,2,3,4,5,6). Данные анализировались в соответствии с CLSI EP9-A2, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient samples (7). Полученные результаты приведены в следующей таблице:

Параметр (%)	**Число образцов**	**Систе-мати-ческая ошиб-ка**	**Lower Limit (Нижний предел)**	**Upper Limit (Верхний предел)**
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,68	0,189	1,173
Гранулоциты MPO+	50	-2,10	-2,754	-1,451
Лимфоциты CD79a+	50	0,36	-0,046	0,765
Лимфоциты CD3+	50	-0,28	-0,958	0,401
Моноциты CD45+	50	0,28	-0,254	0,819
Гранулоциты CD45+	50	-2,54	-3,006	-2,069
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,23	-0,160	0,614
Гранулоциты MPO+	50	-0,78	-1,487	-0,069
Лимфоциты CD79a+	50	0,50	0,090	0,906
Лимфоциты CD3+	50	-0,22	-0,871	0,432
Моноциты CD45+	50	-0,36	-0,787	0,067
Гранулоциты CD45+	50	-1,16	-1,685	-0,626
Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,71	0,285	1,127
Гранулоциты MPO+	50	-2,63	-3,448	-1,803

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Лимфоциты CD79a+	50	0,59	0,211	0,961
Лимфоциты CD3+	50	1,22	0,413	2,033
Моноциты CD45+	50	0,45	-0,025	0,921
Гранулоциты CD45+	50	-2,67	-3,353	-1,989

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,52	0,131	0,899
Гранулоциты MPO+	50	-0,91	-1,619	-0,209
Лимфоциты CD79a+	50	0,41	0,053	0,766
Лимфоциты CD3+	50	1,63	0,946	2,318
Моноциты CD45+	50	0,12	-0,312	0,555
Гранулоциты CD45+	50	-0,88	-1,332	-0,419

Также была проведена оценка эквивалентности использования 4 различных протоколов PerFix-nc (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента, с этапом отмывания или без этапа отмывания) или пермеабилизирующего реагента IntraPrep на 50 образцах костного мозга, отобранных с ЭДТА и протестированных в течение 6 часов после отбора, при тех же условиях, что описаны выше. Полученные результаты приведены в следующей таблице:

Параметр (%)	**Число образцов**	**Систе-мати-ческая ошиб-ка**	**Lower Limit (Нижний предел)**	**Upper Limit (Верхний предел)**
Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO+	50	1,00	0,733	1,260
Гранулоциты MPO+	50	-3,49	-4,216	-2,754
Лимфоциты CD79a+	50	0,02	-1,131	1,177
Лимфоциты CD3+	50	-0,58	-1,753	0,602
Моноциты CD45+	50	0,16	-0,100	0,416
Гранулоциты CD45+	50	-2,43	-3,649	-1,217

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,73	0,487	0,973
Гранулоциты MPO+	50	-1,76	-2,389	-1,122
Лимфоциты CD79a+	50	-0,47	-1,631	0,686

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура фиксации с использованием низкой концентрации реагента PerFix-nc, с этапом отмывания				
Лимфоциты CD3+	50	-1,34	-2,507	-0,183
Моноциты CD45+	50	-0,21	-0,462	0,045
Гранулоциты CD45+	50	-1,26	-2,365	-0,164

Процедура фиксации с использованием высокой концентрации реагента PerFix-nc, без этапа отмывания				
Моноциты MPO+	50	0,80	0,576	1,019
Гранулоциты MPO+	50	-4,19	-4,956	-3,418
Лимфоциты CD79a+	50	0,34	-0,582	1,264
Лимфоциты CD3+	50	0,37	-0,588	1,333
Моноциты CD45+	50	0,39	0,144	0,627
Гранулоциты CD45+	50	-3,14	-4,237	-2,035

Моноциты MPO+	50	0,71	0,500	0,929
Гранулоциты MPO+	50	-1,82	-2,438	-1,210
Лимфоциты CD79a+	50	0,03	-0,842	0,908
Лимфоциты CD3+	50	-0,15	-1,016	0,723
Моноциты CD45+	50	-0,08	-0,348	0,182
Гранулоциты CD45+	50	-1,22	-2,322	-0,113

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитометра, неверной компенсации флуоресценции и неправильной настройке регионов могут быть получены ошибочные результаты.
2. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать приведенную Инструкцию по применению и следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
3. Для оптимальных результатов следует титровать все конъюгированные антитела, используемые для внутриклеточного и внеклеточного окрашивания. Рекомендуется титровать новые антитела параллельно с двумя процедурами (процедура фиксации с использованием высокой или низкой концентрации реагента) и выбрать оптимальные условия.
4. Для некоторых маркеров клеточной поверхности даже относительно низкая концентрация фиксирующего реагента PerFix-nc может негативно влиять на эпитопы клеточной поверхности. В этом случае рекомендуется использовать другой клон антитела или другой маркер (если возможно), или добавить подвергаемые негативному воздействию антитела в образец до этапа фиксации и выполнить предварительную инкубацию с образцом в соответствии с рекомендуемым временем инкубации.
5. В некоторых образцах костного мозга эритробласты могут проявлять устойчивость к лизису и отображаться на гистограмме дифракции света в той же области, что и лейкоциты.
6. Если возможно, целесообразно (и рекомендуется) сгруппировать тесты в несколько серий:

- При проведении нескольких исследований на одном образце крови выполните фиксацию всего имеющегося объема крови. Используйте соотношение объема крови и фиксирующего реагента,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

рекомендованное в процедуре: 5 мкл или 25 мкл фиксирующего реагента на 50 мкл крови. Затем внесите в каждую пробирку 55 мкл или 75 мкл смеси во время инкубации в течение 15 минут (или по истечении 15 минут, если в пробирках уже содержится смесь пермеабилизирующего буферного раствора и антител).

ПРИМЕЧАНИЕ: для некоторых образцов крови дебрис эритроцитов может вызвать значительные помехи на гистограмме SS/FS (бокового / прямого светорассеяния) при фиксации серии проб в ходе процедуры фиксации с использованием высокой концентрации реагента, с этапом отмывания. Чтобы исключить эти помехи рекомендуется использовать стратегию гейтирования.

- При проведении нескольких исследований на различных образцах с одинаковой смесью антител более эффективно готовить смесь пермеабилизирующего буферного раствора + антител для всей серии проб. В этом случае внесите 300 мкл пермеабилизирующего буферного раствора + антитела в каждую пробирку по истечении 15 минут времени фиксации (или во время фиксации всей серии проб).

7. Красители PerCP могут не подходить оптимально для использования с набором PerFix-nc Kit.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X и Pacific Blue являются торговыми марками компании Molecular Probes, Inc.

ProClin является торговой маркой Rohm and Haas Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD13
Клон	Immu103.44
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Mixture of cell lines KG-1a and TF1
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD13-ECD

REF B36286 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD13 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD13 представляет собой ранний индикатор миелоидной линейки. Экспрессия CD13 характерна для области клеток-предшественников костного мозга, он экспрессируется очень рано в процессе дифференциации миелоидной линии до того, как клетки демонстрируют какие бы то ни было морфологические признаки миелоидной дифференциации. Этот индикатор рекомендуется для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML) (1, 2). Рекомендуется одновременная оценка экспрессии других миелоидных маркеров (например, CD65, CD117, CD14, CD15, CD41, CD61, CD64 и гликофорин A) для классификации AML (3). Использование CD13 вместе с миелоидными маркерами (миелопероксидаза и CD33), маркерами B-клеток (CD79 и CD19) и маркерами T-клеток (CD3 и CD7) позволяет идентифицировать более 98% острых лейкозов (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07797).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

   Удалите супернатант путем аспирации и перерастворите клеточную массу, используя 0,5 мл PBS. Пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Показатели по эффективности были получены с помощью вышеописанной процедуры на линии положительных клеток . Анализ был выполнен в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD13, также известная N-аминопептидазой (APN), представляет собой трансмембранную металлопротеазу типа II с молекулярным весом в 150 – 170 kDa. Эта молекула имеет протяженную внеклеточную последовательность и короткую внутрицитоплазматическую область. Молекула CD13 связывает гомодимер нековалентным способом на поверхности клеток (4). Антиген CD13 экспрессируется рано в грануломоноцитарной линии (моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы) и их коммитированных клетках-предшественниках (промежуточные клетки-предшественники, образующие смешанные грануло-моноцитарные колонии или CFU-GM) (4), 5, 6, 7). Молекула CD13 также экспрессируется на клетках не кроветворных тканей, например на эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев, клетках, составляющих щеточную кайму кишечника, эндотелиальных клетках, фибробластах, стромальных клетках костного мозга, остеокластах и базальных клетках из желчных протоков (8). Моноклональное антитело Immu103.44 вступает в периферической крови в реакцию с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами. Оно было отнесено к CD13 во время 3-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (код WS: 285, секция M) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD13-ECD	2,0 Cells/µL
Гранулоциты CD13-ECD +	3,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Моноциты + CD13-ECD	10	97,91	97,14	0,28	1,16	0,29	1,19
Гранулоциты + CD13-ECD	10	100,00	100,00	0,00	0,01	0,00	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип, COULTER, Flow-Check, Flow-Set, ECD, IOTest, Navios, VersaLyse являются торговыми марками компании Beckman Coulter, Inc. и зарегистрированы в Бюро по патентам и товарным знакам США (USPTO).

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD79a
Клон	HM47
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Synthetic peptide (amino acids 202 - 216) of human mb-1 protein containing the cyto-plasmic portion
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD79a-APC

REF B36287 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD79a антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием проточной цитометрии.

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

Проницаемость вызывается в цитоплазмических мембранах лейкоцитов для демонстрации внутриклеточных антигенных детерминантов с помощью моноклональных флуоресцентных антител. После этого лейкоциты анализируются с помощью 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Маркер CD79a используется для диагностики В-клеточных злокачественных заболеваний поскольку позволяет дифференцировать их от миелоидных и Т-клеточных неоплазий. Кроме того, CD79a используется для диагностики пре-В острого лимфобластного лейкоза (пре-В-ОЛЛ) так как многие из этих опухолей негативны по другим В-клеточным маркерам (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Для получения оптимальных результатов рекомендуются следующие реагенты (соблюдайте соответствующую специфичную процедуру).
- Реагент для фиксации/пермеабилизации IntraPrep (№ A07802 или A07803).
- Комплект PerFix-nc (no centrifuge assay kit) для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию (№ B31167 или B31168).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ Intraprep

Ниже описана рекомендуемая процедура для использования реагента для фиксации/пермеабилизации IntraPrep (№ A07802 или A07803).

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ IM2475).

Оптимального окрашивания пробы крови можно достичь с помощью числа лейкоцитов от 3 до 10 x 10^3 клеток/мл. Если концентрация лейкоцитов выше 10 x 10^3 клеток/мл, разведите раствор (2).

1. Добавьте 50 мл образцов крови в ЭДТА в 2 пробирки (одна пробирка для анализа и одна контрольная пробирка).
2. Добавьте в каждую пробирку 100 мл реагента IntraPrep 1 (фиксация).
3. Тщательно перемешайте пробирки на вортексе (3-5 секунд).
4. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
6. Отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Удалите супернатант просредством аспирации.
7. Добавьте 100 мкл реагента 2 (Permeabilization) набора IntraPrep. Дайте смешаться путем диффузии. ВОРТЕКС НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ.
8. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре без встряхивания.
9. Осторожно встряхните пробирки вручную в течение 2-3 секунд.
10. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в контрольную пробирку. Аккуратно вращайте пробирки
11. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
12. Добавьте 4 мл буфера (PBS) и отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре.
13. Удалите супернатант посредством аспирации и ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5-1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution с рабочей концентрацией (1X) (каталожный номер: A07800).
14. Препараты готовы для цитометрического анализа

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты должны храниться более 2-х часов перед цитометрическим анализом рекомендуется хранить их при 2-8°C в защищенном от света месте. Не храните приготовленные таким образом препараты более 24 часов.

ПРОЦЕДУРА С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

Ниже приведена рекомендуемая процедура для использования с комплектом PerFix-nc (no centrifuge assay kit) для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию (№ B31167 или B31168).

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ IM2475).

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА КОМПЛЕКТА

Буферные реагенты PerFix-nc 1 и 2

Разведение не требуется. Оба реагента можно использовать непосредственно из флакона.

Приготовление реагента PerFix-nc буферный раствор 3

Экстемпорально подготовьте финальный реагент 1X.

Разведите 10X концентрированный буферный PerFix-nc 3 (финальный раствор 10X) в деионизированной воде: 1 объем буферного раствора 3 на 9 объемов воды. Хорошо смешайте перед использованием. Мы рекомендуем готовить только объем финального реагента 1X, необходимый для проведения экспериментов в течение одного дня.

1. Внесите пипеткой 50 мл пробы крови на дно каждой пробирки с соответствующей этикеткой. Не наносите кровь на боковые стенки пробирки; в противном случае она не будет обработана должным образом.
2. Введите 5 мл фиксирующего реагента в каждую пробирку.
3. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Еще раз перемешайте зафиксированную кровь и добавьте 300 мл пермеабилизирующего реагента в каждую пробирку; перемешайте немедленно.
5. Немедленно добавьте в каждую пробирку 10 мл конъюгированных с флуорохромом антител против внутриклеточных эпитопов и поверхностных молекул (как вариант, антитела можно предварительно смешать в пермеабилизирующий реагент и добавить все вместе в конце шага фиксации).
6. Немедленно перемешайте и инкубируйте на протяжении 15 - 30 минут при комнатной температуре.
7. Добавьте 3 мл финального реагента 1X (приготовленного из 10X концентрированного финального раствора) к каждую пробирку; немедленно перемешайте; образец готов к анализу в проточном цитометре.

ПРИМЕЧАНИЕ: Препараты могут храниться дольше 24 часов до цитометрического анализа, при этом рекомендуется хранить их при температуре в 2 – 8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности были получены с помощью двух описанных выше процедур на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18 – 25°C. Анализ выполнялся в течение 2 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD79a является частью дисульфидносвязанного гетеродимера CD79a/CD79b, нековалентно прикрепленная к поверхности иммуноглобулинов для формирования рецепторов B-клеток. (BCR) (1). Экспрессия CD79b имеет место на ранних стадиях B-клеточного онтогенеза, и таким образом цитоплазматическую локализацию на стадии pro B. Позже CD79a формирует часть BCR. Мембранная экспрессия сохраняется вплоть до плазмоцитоидной стадии, на которой локализация вновь становится цитоплазматической (3).

Моноклональные антитела HM47 реагируют с внутрицитоплазматическим эпитопом молекулы CD79a (3). CD79a был присвоен им на 5-м совещании по антигенам дифференцировки человека, состоявшемся в 1993 году в Бостоне, США (WS Code: cB017, Section B) (3).

ТОЧНОСТЬ С РЕАГЕНТОМ INTRAPREP

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD79a-APC+	10	1,47	3,60	0,03	0,40	2,30	11,15

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (4)). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Positive Target	Limit of Detection
Лимфоциты CD79a-APC+	2 cells/µL

ТОЧНОСТЬ С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD79a-APC+	10	1,49	4,04	0,11	0,15	7,11	3,73

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (4)). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocyte CD79a-APC+	3 cells/µL

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. 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.
4. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (2).
5. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (5).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Myeloperoxidase
Клон	CLB-MPO-1
Гибридома	SP2/0 x CAF
Иммуноген	Purified myeloperoxydase
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-Myeloperoxydase-PE

REF B36288 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих Myeloperoxidase антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием проточной цитометрии.

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

Проницаемость вызывается в цитоплазмических мембранах лейкоцитов для демонстрации внутриклеточных антигенных детерминантов с помощью моноклональных флуоресцентных антител. После этого лейкоциты анализируются с помощью 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Миелопероксидаза (MPO) — распространенный гемсодержащий белок, важный компонент азурофильных гранул зрелых гранулоцитов и моноцитов. Специфическая экспрессия MPO в нормальных и лейкемических гранулоцитах привела к его рутинному использованию в качестве специфического миелоидного маркера при диагностике и классификации острых лейкозов. MPO играет важную роль в различении острого миелобластного лейкоза (AML) и острого лимфобластного лейкоза (ALL) (1,2,3,4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Для получения оптимальных результатов рекомендуются следующие реагенты (соблюдайте соответствующую специфичную процедуру).
- Реагент для фиксации/пермеабилизации IntraPrep (№ A07802 или A07803).
- Комплект PerFix-nc (no centrifuge assay kit) для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию (№ B31167 или B31168).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A09142.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ Intraprep

Ниже описана рекомендуемая процедура для использования реагента для фиксации/пермеабилизации IntraPrep (№ A07802 или A07803).

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A09142).

Оптимального окрашивания пробы крови можно достичь с помощью числа лейкоцитов от 3 до 10 x 10^3 клеток/мл. Если концентрация лейкоцитов выше 10 x 10^3 клеток/мл, разведите раствор (5).

1. Добавьте 50 мл образцов крови в ЭДТА в 2 пробирки (одна пробирка для анализа и одна контрольная пробирка).
2. Добавьте в каждую пробирку 100 мл реагента IntraPrep 1 (фиксация).
3. Тщательно перемешайте пробирки на вортексе (3-5 секунд).
4. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
6. Отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Удалите супернатант просредством аспирации.
7. Добавьте 100 мкл реагента 2 (Permeabilization) набора IntraPrep. Дайте смешаться путем диффузии. ВОРТЕКС НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ.
8. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре без встряхивания.
9. Осторожно встряхните пробирки вручную в течение 2-3 секунд.
10. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в контрольную пробирку. Аккуратно вращайте пробирки
11. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
12. Добавьте 4 мл буфера (PBS) и отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

13. Удалите супернатант посредством аспирации и ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5-1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution с рабочей концентрацией (1X) (каталожный номер: A07800).
14. Препараты готовы для цитометрического анализа

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты должны храниться более 2-х часов перед цитометрическим анализом рекомендуется хранить их при 2-8°C в защищенном от света месте. Не храните приготовленные таким образом препараты более 24 часов.

ПРОЦЕДУРА С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

Ниже приведена рекомендуемая процедура для использования с комплектом PerFix-nc (no centrifuge assay kit) для подготовки к внутриклеточному и внеклеточному окрашиванию (№ B31167 или B31168).

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A09142).

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА КОМПЛЕКТА

Буферные реагенты PerFix-nc 1 и 2

Разведение не требуется. Оба реагента можно использовать непосредственно из флакона.

Приготовление реагента PerFix-nc буферный раствор 3

Экстемпорально подготовьте финальный реагент 1X.

Разведите 10X концентрированный буферный PerFix-nc 3 (финальный раствор 10X) в деионизированной воде: 1 объем буферного раствора 3 на 9 объемов воды. Хорошо смешайте перед использованием. Мы рекомендуем готовить только объем финального реагента 1X, необходимый для проведения экспериментов в течение одного дня.

1. Внесите пипеткой 50 мл пробы крови на дно каждой пробирки с соответствующей этикеткой. Не наносите кровь на боковые стенки пробирки; в противном случае она не будет обработана должным образом.
2. Введите 25 мл фиксирующего реагента в каждую пробирку.
3. Немедленно перемешайте образцы в перемешивающем устройстве типа «Вортекс» и инкубируйте образцы в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Еще раз перемешайте зафиксированную кровь и добавьте 300 мл пермеабилизирующего реагента в каждую пробирку; перемешайте немедленно.
5. Немедленно добавьте в каждую пробирку 20 мл конъюгированных с флуорохромом антител против внутриклеточных эпитопов и поверхностных молекул (как вариант, антитела можно предварительно смешать в пермеабилизирующий реагент и добавить все вместе в конце шага фиксации).
6. Немедленно перемешайте и инкубируйте на протяжении 15 - 30 минут при комнатной температуре.
7. Добавьте 3 мл финального реагента 1X (приготовленного из 10X концентрированного финального раствора) к каждую пробирку; немедленно перемешайте; образец готов к анализу в проточном цитометре.

ПРИМЕЧАНИЕ: Препараты могут храниться дольше 24 часов до цитометрического анализа, при этом рекомендуется хранить их при температуре в 2 – 8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности были получены с помощью двух описанных выше процедур на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18 – 25°C. Анализ выполнялся в течение 2 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Миелопероксидаза (MPO) – внутриклеточный энзиматический белок, экспрессирующийся на ранних стадиях дифференцировки миелоидной клеточной линии.

Две субъединицы (a и í) имеют молекулярный вес 55 и 15 kDa, соответственно (6,7).

MPO синтезируется преимущественно на стадии формирования промиелоцитов, в течение которой образуются азурофильные (первичные) гранулы (7,8,9). MPO является основной составляющей азурофильных гранул полиморфноядерных нейтрофилов и макрофагов, но не экспрессируется ни лимфоцитами ни эритроцитами (7,9,10).

Моноклональные антитела CLB-MPO-1 распознает как MPO так и предшественник MPO (proMPO; неактивная форма фермента).

ТОЧНОСТЬ С РЕАГЕНТОМ INTRAPREP

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + Anti-MPO-PE	10	96,59	85,03	0,85	3,65	0,88	4,29
Гранулоциты + Anti-MPO-PE	10	99,93	98,98	0,02	2,84	0,02	2,87

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11)). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Positive Target	Limit of Detection
Моноциты + Anti-MPO-PE	1 cell/µL
Гранулоциты + Anti-MPO-PE	2 cells/µL

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОЧНОСТЬ С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Positive Target	Number	Mean (%)		SD		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + Anti-MPO-PE	10	97,15	91,61	0,69	1,24	0,71	1,35
Гранулоциты + Anti-MPO-PE	10	99,86	99,75	0,06	0,11	0,06	0,11

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С РЕАГЕНТОМ PERFIX-NC

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11)). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + Anti-MPO-PE	6 cells/µL
Гранулоциты + Anti-MPO-PE	7 cells/µL

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. 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.
4. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (5).
5. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD33
Клон	D3HL60.251
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	HL60 human cell line
Иммуноглобулин	IgG1 kappa
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD33-PC5.5

REF B36289 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD33 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ антигена CD33 помогает в идентификации бластных клеток миелоидного происхождения (нормальных и злокачественных) и аберрантно экспрессируется популяциями B и T лимфобластной лейкемии/лимфомы (1, 2, 3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A62833).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD33 является трансмембранным мономерным гликопротеином с молекулярным весом 67 кДа. Эта молекула относится к семейству сиалоадгезина: ее адгезивные свойства зависят от присутствия сиаловой кислоты (7). Молекула CD33 экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками из миеломоноцитарных и эритроидных линий клеток, но отсутствует в клетках лимфоидного происхождения (8). Она значительно экспрессируется на моноцитах и незначительно на циркулирующих гранулоцитах. Моноклональное антитело D3HL60.251 было отнесено к CD33 во время 4-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Вене, Австрия, в 1989 году (код WS: 504, секция M) (7).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (6). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD33-PC5,5	3,0 Cells/µL
Гранулоциты CD33-PC5,5 +	5,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + CD33-PC5,5	10	98,66	96,65	0,49	0,60	0,49	0,62
Гранулоциты + CD33-PC5,5	10	99,91	99,90	0,03	0,03	0,03	0,03

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (7).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (8).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD7
Клон	8H8.1
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG2a kappa
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD7-APC
-Alexa Fluor 700

REF B36290 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD7 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии антигена CD7 в качестве индикатора Т-линии в сочетании с экспрессией антигенов CD3 и CD5 полезен для диагностики пролиферативных синдромов Т-клеток, например, острых лимфобластных лейкозов (T-ALL) и пролимфоцитарных лейкозов Т-клеток (1,2,3,4). Их использование параллельно с другими миелоидными маркерами (миелопероксидаза и CD33), а также маркерами В-линии (CD79 и CD19) позволяет идентифицировать более 98% острых лейкозов (1). Антиген CD7 может экспрессироваться определенными острыми незрелыми миелоидными лейкозами (AML) (1). Использование методов измерения было предложено для классификации острых бифенотипических лейкозов (5). В этом контексте антиген CD7 считается скорее индикатором недифференцированной природы новообразования, а не маркером Т-линии (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79391).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD7 является мономерным трансмембранным гликопротеином с молекулярным весом 40 кДа. Дистальная внеклеточная часть этого белка включает уникальный участок типа «вариабельной области иммуноглобулина».

Молекула CD7 экспрессируется рано в онтогенезе Т-клеток (внетимусная протимоцитная стадия) и сохраняется до стадии зрелых Т-клеток лимфоцитов (6,7,8). Антиген CD7 присутствует в тимоцитах, на большинстве циркулирующих Т-клеток лимфоцитов, на NK-клетках, на подгруппе популяции пре-В лимфоцитов, на В-клетках лимфоцитов, происходящих из эмбрионального костного мозга, а также на кроветворных плюрипотентных стволовых клетках (9,10). С другой стороны, зрелые В-клетки лимфоцитов и клетки эритроцитарного, миелоидного и мегакариоцитарного происхождения не экспрессируются CD7 (6,10). Моноклональное антитело 8H8.1 было отнесено к CD7 во время 2-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1984 году (код WS: 38, секция T) (11).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (12). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD7-APC-AF700	2,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD7-APC-AF700	10	87,51	85,14	0,48	0,83	0,55	0,97

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.
8. На субпопуляции лимфоцитов может происходить слабое неспецифичное связывание некоторых доноров с конъюгатами APC-Alexa Fluor 700.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	HLA-DR
Клон	Immu-357
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	EBV-transformed cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 5,9-7,6
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-HLA-DR
-Pacific Blue

REF B36291 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих HLA-DR антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула HLA-DR представляет собой полезный индикатор для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании в рамках расширенной панели иммунофенотипирования. Анализ экспрессии антигена HLA-DR позволяет определить бластные клетки миелоидного происхождения. Их часто наблюдаемый фенотип: HLA-DR+ CD7– CD45 слабый. Однако гипергранулярные лейкозы промиелоцитарного типа (подгруппа LAM-M3) характеризуются слабой экспрессией индикатора HLA-DR или ее полным отсутствием (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело Immu357 распознает эпитоп, который переносится на мономорфном белке в 29 – 33 kDa, идентифицируемый как HLA-DR. Система HLA (антиген лейкоцитов человека) – название главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Зашифрованные 5 локусами (DM, DO, DP, DQ и DR) локуса D молекулы HLA класса II также называют антигенами HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (2,3). Экспрессия антигенов класса II ограничена антиген-презентирующими клетками, то есть B-лимфоцитами, моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса кожи (3,4). На тимоцитах антиген HLA-DR экспрессируется только после активации (5). Стволовые клетки и кроветворные клетки-предшественники экспрессируют его до определенной стадии своей дифференциации (3,6).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (7). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + HLA-DR-PBE	3,0 Cells/ µL
Моноциты + HLA-DR-PBE	2,0 Cells/ µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + HLA-DR-PBE	10	16,17	17,37	1,13	0,70	6,96	4,01
Моноциты + HLA-DR-PBE	10	99,67	99,37	0,17	0,26	0,17	0,26

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD16
Клон	3G8
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human neutrophils
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 6,50-7,80
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD16-Pacific Blue

REF B36292 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD16 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
При злокачественных заболеваниях кроветворной системы экспрессия CD16 на определенных типах клеток лейкемии имеет значение при определении прогноза (1,2). Популяция, определенная как T NK-подобные клетки CD16+, оказывается полезной при определении активности болезни при некоторых типах CLL (3). Важно то, что недавние клинические исследования выявили, что CD16 является потенциальным кандидатом для разработки новой иммунотерапии для борьбы с лейкемией B-клеток и AML на основе клеток (4,5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD16 представляет собой низкоаффинный рецептор IgG (FcγRIII), связывающий иммунные комплексы, но не мономерный IgG. Антиген CD16 существует в двух различных формах, зашифрованных в двух различных генах: FcγRIIIA (или III-2) и FcγRIIIB (или III-1). Генетическая гетерогенность CD16 приводит к появлению альтернативных молекул, связанных с мембраной. Одна из них – трансмембранная форма (FcγRIIIA, 50 – 65 kDa), экспрессированная на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Другая — форма, связанная с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) (FcγRIIIB, 48 kDa), экспрессируемая только на нейтрофилах (6,7).

Было показано, что антиген CD16 не может быть нековалентно связан в мембране NK-клеток с цепью 16 kDa CD3ζ (8) или с двумерной цепью FcRγ (9). Моноклональное антитело 3G8 (mAb) связывается с FcγRIIIA, а также с FcγRIIIB (сильно). Было показано, что оно почти полностью блокирует связывание димеров IgG с FcγRIIIB (10). Эксперименты, в которых к молекуле FcγRIIIB были применены аминокислотные мутации, показали, что на 3G8 mAb оказывают влияние замены Lys162 и Val164 в цикле FG проксимального по отношению к мембране области молекулы, похожей на Ig (11). 3G8 mAb была присвоена CD16 во время Пятого семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1993 году (12).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (13). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD16-Pacific Blue	4,0 Cells/µL
Гранулоциты CD16-Pacific Blue +	2,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD16-Pacific Blue	10	8,54	9,86	0,23	0,41	2,72	4,20
Гранулоциты + CD16-Pacific Blue	10	94,97	99,04	1,74	0,11	1,83	0,12

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (14).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (15).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD22
Клон	SJ10.1H11
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human NALM1 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD22-APC
-Alexa Fluor 700

REF B36293 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD22 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD22 выявляется в цитоплазме рано в онтогенезе B-клетки (поздняя pro-B стадия), появляется на поверхности клетки одновременно с экспрессией мембранного IgD и обнаруживается на большинстве зрелых B-лимфоцитов (1,2). Антиген CD22 исчезает на конечных стадиях дифференциации до стадии плазматических клеток (1). В периферической цельной крови экспрессия антигена CD22 ограничена B-лимфоцитами. Антиген CD22 полезен при фенотипировании большинства лейкозов B-клеток и почти всех лимфом B-клеток в сочетании с другими маркерами (3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79391).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD22 представляет собой одноцепочечную трансмембранную молекулу типа I с молекулярным весом в 130 – 140 kDa, состоящую из семи иммуноглобулино-подобных (Ig-подобных) областей (1). Поскольку эти области, входящие в суперсемейство иммуноглобулинов (IgSF), демонстрируют свойства белков, связывающих сиаловую кислоту, CD22 входит в семейство сиалоадгезинов, как и CD33 и связанный с миелином гликопротеин (MAG) (4). N-терминальная область, дистальная по отношению к мембране, представляет собой Ig-область V-типа, в то время как другие шесть областей, проксимальные по отношению к мембране, представляют собой Ig-области C2-типа (4). Цитоплазматическая область CD22 включает шесть тирозинов, представляющих собой возможные цели для фосфорилирования. Некоторые области внутрицитоплазматического хвоста представляют гомологию мотивов активации на основе тирозина (ITAM), некоторые другие – с мотивами ингибиции на основе тирозина (ITIM) (4,5). CD22 оказывается последовательно связанным с BCR (рецептор антигена B-клетки), и это может включать распознавание CD22 детерминант углеводов mIgM (6,7,8). CD22 является посредником при адгезии взаимодействия B-B лимфоцитов, а также B-клеток и взаимодействия эритроцитов и лейкоцитов (4,7,9,10).

Моноклональное антитело SJ10.1H11 было отнесено к кластеру дифференциации CD22 на втором Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Бостоне (1984) (11).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (12). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD22-APC-AF700	2,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD22-APC-AF700	10	14,04	6,31	0,45	0,23	3,19	3,72

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.
8. На субпопуляции лимфоцитов может происходить слабое неспецифичное связывание некоторых доноров с конъюгатами APC-Alexa Fluor 700.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1 kappa
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Krome Orange
концентрация	Krome Orange / Ig: 10,40-14,10
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	528 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45
-Krome Orange

REF B36294 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD45 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (12). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD45-KO	2,0 Cells/µL
Моноциты + CD45-KO	2,0 Cells/µL
Гранулоциты CD45-KO +	3,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD45-KO	10	99,26	99,48	0,20	0,13	0,21	0,13
Моноциты + CD45-KO	10	99,78	99,92	0,19	0,06	0,19	0,06
Гранулоциты + CD45-KO	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (15,9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD11b
Клон	Bear1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Purified human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1 kappa
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD11b-APC
-Alexa Fluor 750

REF B36295 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD11b антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD11b полезен для выявления и определения нарушений со стороны кроветворной системы (1, 2, 3). Молекула CD11b экспрессируется при остром монобластном лейкозе и остром моноцитарном лейкозе. Аномалии экспрессии CD11b имеют прогностическое значение при миелодиспластических синдромах (MDS). Пациенты с низким процентом клеток костного мозга, экспрессирующих CD11b, подвержены более высокому риску эволюции в острый миелоидный лейкоз по сравнению с пациентами, у которых более 53% клеток костного мозга экспрессируют CD11b (1). Кроме того, CD11b иногда наблюдается на Т-клетках лейкоза больших гранулярных лимфоцитов (4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD11b также имеет несколько других названий, например интегриновая цепь alpha-M, Mac-1, CR3, iC3bR или Mo1 (5, 6). Он представляет собой интегральный трансмембранный гликопротеин типа I на 170 – 165 kDa в восстановительных/невосстановительных условиях соответственно. CD11b демонстрирует 19 потенциальных центров N-гликолизирования (5).

Экспрессия цепи CD11b на поверхности клетки требует присутствия антигена CD18 (также известного как интегриновая цепь beta2). Эти две субъединицы сочетаются и создают интегрин CD11b/CD18, один из 4 интегриновых гетеродимеров, которые можно построить путем ассоциации бета-цепи CD18 с 4 отличительными альфа-цепями CD11. Интегрин CD11b/CD18 (αMβ2) также называется Mac-1. Интегрин CD11b/CD18 имеет широкие возможности связывания лигандов. Он может распознавать CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, компонент комплемента iC3b, фибриноген и LPS/LBP (комплекс липосахарида (LPS) и белок, связывающий LPS) среди других лигандов (7). Кроме того, существуют признаки внутримембранного взаимодействия CD11b/CD18 с такими связанными с GPI поверхностными молекулами, как CD16 или CD14 (8). Эти взаимодействия могут обеспечивать трансмембранные сигналы и функции эффектора связанных с GPI рецепторов мембраны. CD11b/CD18 сильно выражается на NK-лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах и макрофагах.

Моноклональное антитело BEAR1 (6) было отнесено к CD11b во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: A015, секция адгезивных молекул) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD11b-APC-AF750	3 Cells/µL
Моноциты + CD11b-APC-AF750	1 Cell/µL
Гранулоциты + CD11b-APC-AF750	1 Cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD11b-APC-AF750	10	24,08	18,66	0,59	0,33	2,43	1,74
Моноциты + CD11b-APC-AF750	10	98,80	99,22	0,44	0,33	0,45	0,33
Гранулоциты + CD11b-APC-AF750	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD11b
Клон	Bear1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Purified human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 6-8
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD11b
-Pacific Blue

REF B36296 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD11b антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD11b полезен для выявления и определения нарушений со стороны кроветворной системы (1, 2, 3). Молекула CD11b экспрессируется при остром монобластном лейкозе и остром моноцитарном лейкозе. Аномалии экспрессии CD11b имеют прогностическое значение при миелодиспластических синдромах (MDS). Пациенты с низким процентом клеток костного мозга, экспрессирующих CD11b, подвержены более высокому риску эволюции в острый миелоидный лейкоз по сравнению с пациентами, у которых более 53% клеток костного мозга экспрессируют CD11b (1). Кроме того, CD11b иногда наблюдается на Т-клетках лейкоза больших гранулярных лимфоцитов (4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD11b также имеет несколько других названий, например интегриновая цепь alpha-M, Mac-1, CR3, iC3bR или Mo1 (5, 6). Он представляет собой интегральный трансмембранный гликопротеин типа I на 170 – 165 kDa в восстановительных/невосстановительных условиях соответственно. CD11b демонстрирует 19 потенциальных центров N-гликолизирования (5).

Экспрессия цепи CD11b на поверхности клетки требует присутствия антигена CD18 (также известного как интегриновая цепь beta2). Эти две субъединицы сочетаются и создают интегрин CD11b/CD18, один из 4 интегриновых гетеродимеров, которые можно построить путем ассоциации бета-цепи CD18 с 4 отличительными альфа-цепями CD11. Интегрин CD11b/CD18 (αMβ2) также называется Mac-1. Интегрин CD11b/CD18 имеет широкие возможности связывания лигандов. Он может распознавать CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, компонент комплемента iC3b, фибриноген и LPS/LBP (комплекс липосахарида (LPS) и белок, связывающий LPS) среди других лигандов (7). Кроме того, существуют признаки внутримембранного взаимодействия CD11b/CD18 с такими связанными с GPI поверхностными молекулами, как CD16 или CD14 (8). Эти взаимодействия могут обеспечивать трансмембранные сигналы и функции эффектора связанных с GPI рецепторов мембраны. CD11b/CD18 сильно выражается на NK-лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах и макрофагах.

Моноклональное антитело BEAR1 (6) было отнесено к CD11b во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: A015, секция адгезивных молекул) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD11b-Pacific Blue	2,0 Cells/ µL
Моноциты + CD11b-Pacific Blue	2,0 Cells/ µL
Гранулоциты CD11b-Pacific Blue +	1,0 Cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD11b-Pacific Blue	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Моноциты + CD11b-Pacific Blue	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Гранулоциты + CD11b-Pacific Blue	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD14
Клон	RMO52
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Isolated human monocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 6,5-10
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD14-FITC

REF B36297 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD14 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и умеренно – на нейтрофилах, подгруппе популяции дендритных клеток и макрофагах. CD14 – полезный индикатор для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML). Одновременный анализ экспрессии антигенов CD14 и CD13 помогает дифференцировать M4 AML (1) с моноцитарной онтогенностью (CD14+CD13+ фенотип) от M2 AML с немоноцитарной онтогенностью (CD14–CD13+ фенотип) (2; 3; 4; 5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A12689).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A12689).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Показатели по эффективности были получены с помощью вышеописанной процедуры на линии положительных клеток . Анализ был выполнен в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD14 представляет собой белок молекулярным весом в 53 – 55 kDa, связанных в мембране с помощью группы гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (6). Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и макрофагах и умеренно — на многоядерных нейтрофилах периферической крови; он также присутствует на плевральных фагоцитах и дендритных ретикулярных клетках. CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарной линейки и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Он отсутствует в Т-лимфоцитах, а также в NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (7).

Моноклональное антитело RMO52 было отнесено к CD14 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: MA62, секция M) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (8). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD14-FITC	2,0 Cells/µL
Гранулоциты CD14-FITC +	2,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + CD14-FITC	20	94,45	96,36	1,07	0,5	1,13	0,52
Гранулоциты + CD14-FITC	20	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD15
Клон	80H5
Гибридома	MOPC 315-43 x balb/c
Иммуноген	Human granulocytes
Иммуноглобулин	IgM
Вид	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 12-14
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD15-FITC

REF B36298 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD15 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD15 ценен для выявления и определения различных нарушений со стороны кроветворной системы (1). Выявление CD15 может быть полезным на нескольких стадиях заболевания. Он оказался ключевым индикатором для мониторинга прогресса заболевания при миелодиспластических синдромах, обеспечивая возможность определения зрелости миелобластов (2). CD15 представляет собой диагностический и прогностический инструмент для острых миелоидных лейкозов (3) и экспрессируется почти у всех пациентов с хронической гранулоцитарной лейкемией (4, 5). CD15 также представляет собой рекомендованный индикатор линии для идентификации нейтрофилов при диагностике PNH (6).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07795).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD15 (Lewis x/Lex) представляет собой молекулу лакто-N-(нео) фукопентаозы III. Этот эпитоп углевода переносится гликолипидами и гликопротеинами, экспрессируемыми на клеточной мембране. Антиген CD15 сильно экспрессируется нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами и нормальными миелоидными клетками-предшественниками. Он не экспрессируется на нормальных эритроцитах, тромбоцитах или лимфоцитах. Антитело 80H5 распознает ранний миелоидный дифференцирующий эпитоп, который обнаруживается на метамиелоцитах, миелоцитах, промиелоцитах и активированных макрофагах. Оно также вступает в реакцию с гранулоцитами. Моноклональное антитело 80H5 было отнесено к кластеру дифференциации CD15 на Пятом Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Бостоне, США (1993) (7, 8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD15-FITC	2,0 Cells/µL
Гранулоциты CD15-FITC +	2,0 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + CD15-FITC	10	99,76	98,91	0,18	0,34	0,18	0,35
Гранулоциты + CD15-FITC	10	99,98	99,95	0,01	0,06	0,01	0,06

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).
7. Известно, что моноклональные антитела изотипа IgM к антигену Lewis x, например, 80H5 (CD15), вызывают агрегацию клеток миеломоноцитарного происхождения (12). Подобные агрегаты могут исключаться из рассматриваемых селекторов и приводить к неточности оценок положительных клеток на CD15.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD65
Клон	88H7
Гибридома	MOPC 315 x balb/c
Иммуноген	HL60 promyelocytic cell line
Иммуноглобулин	IgM
Вид	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 18-25
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD65-FITC

REF B36299 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD65 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD65 – полезный маркер для определения острого миелоидного лейкоза (AML). При использовании в сочетании с CD34 и CD117, двумя другими маркерами, также экспрессируемыми на очень ранних шагах миелоидной дифференциации, он позволяет выявить аномалии созревания и изучить минимальную остаточную болезнь (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07795).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD65 имеет углеводную структуру, аналогичную тем, которые распознаются антителами CD15. CD65 представляет собой цепочечный фукоганглиозид типа II, включающий олигосахаридную последовательность: Galβ1-4GlcNacβ1-3Galβ1-4GlcNac(Fucα1-3)β1-R. Гранулоциты высоко экспрессируют антиген CD65, в то время как моноциты являются слабо положительными на CD65 (2, 3). Моноклональное антитело (mAb) 88H7 изучалось во время 4-го Международного семинара по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека (HLDA) в Вене, Австрия, в 1989 году (2). Оно было отнесено к кластеру дифференциации CD65 на 6-м Международном семинаре HDLA в Кобе, Япония, в 1996 году (4).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (5). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD65-FITC	2,0 Cells/µL
Гранулоциты CD65-FITC +	1,0 Cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + CD65-FITC	10	99,31	99,32	0,29	0,25	0,29	0,25
Гранулоциты + CD65-FITC	10	99,88	99,97	0,10	0,04	0,10	0,04

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD117
Клон	104D2D1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	MOLM-1 leukaemic cell line
Иммуноглобулин	IgG1 kappa
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD117-APC

REF B36300 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD117 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Поскольку его экспрессия происходит именно на ранней стадии гематопоэза, CD117 может быть индикатором острого лейкоза, особенно миелоидной линии (1-2). В небольшом числе случаев острого Т-лейкоза (T-ALL) сообщалось о положительной реакции на CD117, а экспрессия CD117 в случае В-клеток-предшественников-ALL встречается редко (1,3). Исследования показали, что CD117 может быть связан с мастоцитозом (3,4). Одновременный анализ антигенов CD34 и CD117 помогает в определении бластных клеток миелоидного происхождения: степень незрелости определяется экспрессией CD34, а миелоидное происхождение — коэкспрессия CD117 (1,3,5,6,2,4).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ IM2475).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD117, также известен как рецептор фактора стволовых клеток (SCFR), комплект тучных клеток и рецептор стального фактора, представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 145 kDa, зашифрованный набор протоонкогена (1). Молекула CD117 относится к семейству рецепторной тирозинкиназы класса III (RTK). В кроветворной системе молекула CD117 экспрессируется приблизительно на 50% клеток-предшественников CD34+, задействованных в эритроцитарной (7), миеломоноцитарной и мегакариоцитарной дифференциации (3,8). Хотя CD117 в первую очередь является индикатором нелимфоидных клеток-предшественников, сообщалось о его выявлении на ранних лимфоидных клетках-предшественниках (8,9). Экспрессия CD117 была выявлена на небольшой подгруппе покоящихся NK-клеток (яркий CD56) и приблизительно на 30% незрелых CD3– CD4– CD8– тимоцитов (3). CD117 также экспрессируется на тучных клетках (3,8) и выявляется на некроветворных клетках, например, в репродуктивной системе, меланоцитах и эмбриональных клетках мозга (8).

MAb 104D2D1 было отнесено к CD117 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: C-30. Секция C) (8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (10). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD117+	3 Cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток (MO7E) в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
CD117+	10	99,11	98,98	0,15	0,10	0,15	0,10

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Lambda
Клон	NA
Гибридома	NA
Иммуноген	Polyclonal immunoglobulin light chains of lambda type isolated from a pool of human sera
Иммуноглобулин	Polyclonal
Вид	Кролик
Очистка	NA
Флуорохром	R Phycoerythrin
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-Lambda-PE

REF B49174 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих Lambda антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
У здоровых людей 30–40% В-лимфоцитов продуцируют легкие цепи лямбда, а остальные В-лимфоциты продуцируют легкие цепи каппа (1). Анализ экспрессии легких цепей каппа и лямбда на В-клетках обеспечивает представление о развитии и приобретении функциональных свойств, и таким образом особенно ценен при диагностике пролиферативных злокачественных новообразований (2, 3).

Так как отдельные лимфоциты могут нести только один тип легких цепей (каппа или лямбда), исследование распределения и распространенности определенной легкой цепи позволяет выполнять идентификацию клональной экспансии пролиферативных заболеваний. Определение клональной экспансии В-лимфоцитов, основанное на изменении соотношения экспрессии каппа / лямбда, представляет собой важный диагностический критерий для В-клеточных злокачественных новообразований, в том числе пролиферации незрелых, реактивных и злокачественных лейкозных клеток/лимфомы и плазмацитомы/множественной миеломы (3, 4).

Соответственно, анализ моноклональности В-клеток важен для диагностики следующих заболеваний: хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфома, пролимфоцитарный лейкоз, лимфома из мантийных клеток, фолликулярная лимфома и лифмома маргинальной зоны, а также волосковоклеточный лейкоз (5, 6). Анализ соотношения клеток, экспрессирующих цепь каппа, относительно клеток, экспрессирующих цепь лямбда, также важен для различения вторичного гиперлимфоцитоза и лимфопролиферативных синдромов (5).

Обычно в В-вторичных популяциях соотношение каппа/лямбда составляет от 1/1 до 2/1, в то время как при экспансии клональных В-клеток оно обычно превышает 3/1. Анализ клональности как часть иммунофенотипического профилирования многопараметрической проточной цитометрией всегда следует оценивать совокупно с другими результатами испытаний (морфологическая цитогенетика, молекулярные маркеры) и клиническими особенностями для правильной классификации каждой нозологической единицы (7, 8, 9, 10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Реагент селекции (например, CD19-APC-Alexa 750, REF A94681)
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОТМЫВКОЙ

Примечание. Не ссылайтесь на инструкции для лизирующего реагента. Следуйте рекомендованному методу, описанному ниже.

1. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок.
2. Добавьте в каждую пробирку по 3 мл PBS.
3. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
4. Удаляют супернатант аспирацией.
5. Затем выполняют лизис эритроцитов, например, при желании использовать VersaLyse (REF A09777), следуют приводимой ниже методике.
6. Добавляют 1 мл фиксирующей и лизирующей смеси «Fix-and-Lyse», приготовленной для немедленного применения путем смешивания 1 мл VersaLyse + 0,025 мл фиксирующего раствора IOTest3 10x Fixative Solution (REF A07800).
7. Немедленно перемешивают на вортексе от 1 до 2 секунд и инкубируют в течение 10 минут при комнатной текмпературе, защищая от света.
8. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
9. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией, добавляют по 3 мл PBS в каждую пробирку.
10. Повторяют этапы 8 и 9.
11. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
12. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя 0,1 мл PBS

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

13. Добавляют подходящий объем реагента селекции конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку
14. Добавляют 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку. Немедленно перемешивают на вортексе от 1 до 2 секунд
15. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
16. Добавьте в каждую пробирку по 3 мл PBS.
17. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
18. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

    0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

    0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

    Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Цепь лямбда (λ) — полипептид длиной 25 Kd, получаемый при папаиновом расщеплении молекулы IgG, кодированной локусом лямбда человеческого иммуноглобулина (1). Структура субъединиц IgG представляет собой две легких цепи и две тяжелых цепи. Антитела продуцируются В-лимфоцитами, каждый из которых экспрессирует только один класс легких цепей. После установления класс легкой цепи остается без изменений в течение всей жизни В-лимфоцита. У здорового человека общее соотношение каппа и лямбда составляет приблизительно 3:1 в сыворотке (при измерении интактных целых антител) и на клеточной поверхности лимфоцитов.

Иные соотношения распределения цепей каппа / лямбда могут указывать на злокачественное новообразование. Каждая легкая цепь состоит из двух тандемных иммуноглобулиновых доменов: a) одного вариабельного домена (VL) и b) одного постоянного (CL) домена. В то время как VL демонстрирует значительное разнообразие последовательностей, CL демонстрирует внутреннюю гомологию с повторяющимися единицами. Этот характер организации определяет участок связывания и специфичность антитела.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD19/Lambda-PE	2,0 cells /µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD19/Lambda-PE	10	38,50	39,15	1,74	1,39	4,52	3,56

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	TCR γ/δ
Клон	IMMU510
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Soluble g/d receptor
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate
концентрация	FITC / Ig: 4 - 6,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-TCR PAN γ/δ-FITC

REF B49175 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих TCR γ/δ антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
В отличие от Т-клеток, экспрессирующих альфа-бета (αβ) рецепторы, гамма-дельта (γ/δ) Т-клетки представляют небольшое подмножество (от 1,6 до 6,9%) CD3+ Т-клеток периферической крови (1, 2). В Т-клетках человека только два продукта δ генов, Vδ1 и Vδ2, часто используются γ/δ Т-клетками. TCR PAN гамма-дельта клон IMMU510 распознает цепи δ и три изоформы рецепторов γ/δ Т-клеток. Vδ1-и/или Vδ2-экспрессирующие Т-клетки можно легко определять и изучать проточной цитометрией. Изменения распределения различных подмножеств γ/δ Т-клеток наблюдались у некоторых пациентов с инфекцией ВИЧ (3).

Оценка проточной цитометрии пропорций репертуара TCRβ α/β Т-клеток и Т-клеток фенотипа TCRgd является чувствительным методом для оценки клональности Т-клеток (4). Молекулы антигенов, активирующие гамма-дельта Т-клетки, до сих пор преимущественно неизвестны. γ/δ Т-клетки специфичны тем, что им не требуется обработка антигеном и презентация эпитопов белка большого комплекса гистологической совместимости (MHC), хотя некоторые распознают молекулы MHC класса Ib (1, 2).

Исследования по описанию γ/δ Т-клеточных популяций методом проточной цитометрии, определили снижение с возрастом частоты γ/δ Т-клеток, но не α/β Т-клеток (5). В недавней работе было показано, что человеческие Vγ9/Vδ2 Т-клетки также способны к фагоцитозу, функции, ранее приписываемой исключительно незрелым клеткам миелоидного происхождения, таким как нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки (6).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Реагент селекции (например, CD3-APC-Alexa 750, REF A94680)
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАГЕНТА СЕЛЕКЦИИ

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавляют соответствующий объем реагента селекции конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую и контрольную пробирку.
3. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
4. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
6. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
7. Удаляют супернатант аспирацией.
8. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
9. Повторяют этап 6
10. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

    0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

11. Удалите супернатант путем аспирации и перерастворите клеточную массу, используя 0,5 мл PBS. Пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов.

    Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

TCR – это молекулярный комплекс, который содержит две единицы: распознающую, состоящую из альфа-бета или из гамма-дельта гетеродимеров, присутствующих на поверхности клеток взаимно исключающим образом, и трансдуцирующую единицу, комплекс CD3, общий для альфа-бета и гамма-дельта гетеродимеров, инициирующий Т-клетки, когда распознающая единица занимается антигеном. Распознающая единица распознает инородные антигены, и разнообразие, необходимое для этой функции распознавания, создается соматической рекомбинацией генов TCR (7, 8, 9).

Существуют четыре локуса гена TCR (альфа, бета, гамма и дельта). Каждый из них состоит из нескольких сегментов V (вариабельных), кодирующих приблизительно 90 аминокислот, очень коротких сегментов D (отвечающих за разнообразие) (только локусы α и дельта) и коротких сегментов J (связывающих) (около 15 аминокислот) и одного или двух сегментов C (постоянных) (10, 11). Большинство Т-клеток экспрессируют белок альфа/бета TCR (рецептор Т-клетки) и небольшая популяция Т-клеток экспрессирует гамма/дельта TCR, который обычно имеет дважды отрицательный (CD4/CD8) фенотип.

Гамма/дельта Т-клетки обычно являются первой линией защиты на эпидермальной и эпителиальной поверхностях и представляют 10–12% лимфоцитов в селезенке (12). IMMU 510 распознают все гамма/дельта Т-клетки вне зависимости от экспрессирующих вариабельных генов или связывающих регионов, что было показано иммунофлуоресцентными исследованиями с помощью проточной цитофлуориметрии как на поликлональных гамма/дельта Т-клеточных линиях, так и на гамма/дельта Т-клонах (13, 14, 15, 16, 17).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD3 / TCR-FITC	3,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD3 / TCR-FITC	10	18,87	2,43	0,28	0,10	1,48	3,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	TCR γ/δ
Клон	IMMU510
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Soluble g/d receptor
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-TCR PAN γ/δ-PE

REF B49176 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих TCR γ/δ антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
В отличие от Т-клеток, экспрессирующих альфа-бета (αβ) рецепторы, гамма-дельта (γ/δ) Т-клетки представляют небольшое подмножество (от 1,6 до 6,9%) CD3+ Т-клеток периферической крови (1, 2). В Т-клетках человека только два продукта δ генов, Vδ1 и Vδ2, часто используются γ/δ Т-клетками. TCR PAN гамма-дельта клон IMMU510 распознает цепи δ и три изоформы рецепторов γ/δ Т-клеток. Vδ1-и/или Vδ2-экспрессирующие Т-клетки можно легко определять и изучать проточной цитометрией. Изменения распределения различных подмножеств γ/δ Т-клеток наблюдались у некоторых пациентов с инфекцией ВИЧ (3).

Оценка проточной цитометрии пропорций репертуара TCRβ α/β Т-клеток и Т-клеток фенотипа TCRgd является чувствительным методом для оценки клональности Т-клеток (4). Молекулы антигенов, активирующие гамма-дельта Т-клетки, до сих пор преимущественно неизвестны. γ/δ Т-клетки специфичны тем, что им не требуется обработка антигеном и презентация эпитопов белка большого комплекса гистологической совместимости (MHC), хотя некоторые распознают молекулы MHC класса Ib (1, 2).

Исследования по описанию γ/δ Т-клеточных популяций методом проточной цитометрии, определили снижение с возрастом частоты γ/δ Т-клеток, но не α/β Т-клеток (5). В недавней работе было показано, что человеческие Vγ9/Vδ2 Т-клетки также способны к фагоцитозу, функции, ранее приписываемой исключительно незрелым клеткам миелоидного происхождения, таким как нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки (6).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Реагент селекции (например, CD3-APC-Alexa 750, REF A94680)
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАГЕНТА СЕЛЕКЦИИ

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавляют соответствующий объем реагента селекции конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую и контрольную пробирку.
3. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
4. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
6. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
7. Удаляют супернатант аспирацией.
8. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
9. Повторяют этап 6
10. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

    0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

TCR – это молекулярный комплекс, который содержит две единицы: распознающую, состоящую из альфа-бета или из гамма-дельта гетеродимеров, присутствующих на поверхности клеток взаимно исключающим образом, и трансдуцирующую единицу, комплекс CD3, общий для альфа-бета и гамма-дельта гетеродимеров, инициирующий Т-клетки, когда распознающая единица занимается антигеном. Распознающая единица распознает инородные антигены, и разнообразие, необходимое для этой функции распознавания, создается соматической рекомбинацией генов TCR (7, 8, 9).

Существуют четыре локуса гена TCR (альфа, бета, гамма и дельта). Каждый из них состоит из нескольких сегментов V (вариабельных), кодирующих приблизительно 90 аминокислот, очень коротких сегментов D (отвечающих за разнообразие) (только локусы α и дельта) и коротких сегментов J (связывающих) (около 15 аминокислот) и одного или двух сегментов C (постоянных) (10, 11). Большинство Т-клеток экспрессируют белок альфа/бета TCR (рецептор Т-клетки) и небольшая популяция Т-клеток экспрессирует гамма/дельта TCR, который обычно имеет дважды отрицательный (CD4/CD8) фенотип.

Гамма/дельта Т-клетки обычно являются первой линией защиты на эпидермальной и эпителиальной поверхностях и представляют 10–12% лимфоцитов в селезенке (12). IMMU 510 распознают все гамма/дельта Т-клетки вне зависимости от экспрессирующих вариабельных генов или связывающих регионов, что было показано иммунофлуоресцентными исследованиями с помощью проточной цитофлуориметрии как на поликлональных гамма/дельта Т-клеточных линиях, так и на гамма/дельта Т-клонах (13, 14, 15, 16, 17).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD3 / TCRγ/δ-PE	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD3 / TCRγ/δ-PE	10	15,33	5,41	0,38	0,18	2,45	3,27

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	TCR α/β
Клон	IP26A
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell clone
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-TCR PAN α/β-PE

REF B49177 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих TCR α/β антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
TCR — это гетеродимерный белок, обычно состоящий из двух субъединиц α и β, закрепленных в клеточной мембране и связанных друг с другом дисульфидной связью. Они представляются как часть комплекса с молекулами инвариантной цепочки CD3. Большинство Т-клеток (95%) имеют данный рецептор, они называются Т-клетками αβ, в то время как в меньшей части Т-клеток (5%) присутствует альтернативный рецептор, сформированный переменной гамма- (γ) и дельта- (δ) цепочками. Они называются Т-клетками γ/δ (1).

Оценка проточной цитометрии пропорций репертуара TCRβ α/β Т-клеток и Т-клеток фенотипа TCRgd является чувствительным методом для оценки клональности Т-клеток (2). Сигнал от Т-клеточного комплекса усиливается за счет одновременного связывания молекул MHC определенным корецептором. В Т-хелперах таким корецептором является CD4, он характерен для MHC класса II. В цитоксических Т-клетках таким корецептором является CD8, он характерен для молекул MHC класса I (3).

Корецептор не только обеспечивает специфичность TCR к воздействию антигена, но также способствует продолжительному взаимодействию между клеткой, представляющей антиген, и Т-клеткой и подбирает необходимые молекулы (например, LCK) внутри клетки, участвующих в сигнализации активированного Т-лимфоцита (4). Участие TCR инициирует положительные (усиливающие сигналы) и отрицательные (подавляющие сигналы) каскады, которые в конечном счете приводят к клеточной пролиферации, дифференциации, выработке цитокина и/или связанной с активацией гибели клеток. Эти сигнальные каскады регулируют появление Т-клеток, гомеостаз, активацию, приобретение функций эффектора и апоптоз (4, 5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Т-клетки человека распознают посторонние антигены в контексте принимающих HLA-молекул через Т-клеточный рецептор для антигена (TcR) (6, 7, 8). TcR – это молекулярные комплексы, которые содержат две единицы: распознающую, состоящую из α-β или из γ-δ гетеродимеров, присутствующих на поверхности клеток взаимно исключающим образом, и трансдуцирующую единицу, комплекс CD3, общий для α-β и γ-δ гетеродимеров, инициирующий Т-клетки, когда распознающая единица занимается антигеном.

Распознающие единицы распознают возможные инородные антигены, и разнообразие, необходимое для этой функции распознавания, создается соматической рекомбинацией генов TcR. Существуют четыре генных локуса TcR (α, β, γ и δ). Каждый из них состоит из нескольких сегментов V (для обеспечения вариабельности), кодирующих приблизительно 90 аминокислот, очень коротких сегментов D (отвечающих за разнообразие) (только локусы α и δ) и коротких сегментов J (связывающих) (около 15 аминокислот) и одного или двух сегментов C (постоянных) (9, 10, 11, 12). Антитело IP26A распознает мономорфный детерминант цепочки α/β человека из комплекса TcR(13, 14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты TCR-PE +	6,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + TCR-PE	10	72,56	61,88	0,56	0,35	0,78	0,56

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Kappa
Клон	NA
Гибридома	NA
Иммуноген	Polyclonal immunoglobulin light chains of kappa type isolated from a pool of human sera
Иммуноглобулин	Fab'2 Polyclonal
Вид	Кролик
Очистка	NA
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate
концентрация	FITC / Ig:1,9 - 3,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-Kappa-FITC

REF B49178 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих Kappa антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ легких цепей предоставляет прямую информацию о развитии и приобретении функциональных свойств В-клеток, что полезно при диагностике гематопоэтических заболеваний, особенно пролиферативных злокачественных новообразований (1, 2). У здоровых людей 60-70% В-лимфоцитов продуцируют легкие цепи каппа, а остальные В-клетки продуцируют легкие цепи лямбда (3). Благодаря тому факту, что отдельные лимфоциты могут нести только один тип легких цепей (каппа или лямбда), исследования распределения и распространенности определенных легких цепей позволяют выполнять идентификацию клональной экспансии пролиферативных заболеваний.

Определение клональной экспансии В-лимфоцитов, основанное на изменении соотношения экспрессии каппа / лямбда, представляет собой важный диагностический критерий для В-клеточных злокачественных новообразований (4). Соответственно, анализ моноклональности В-клеток важен для диагностики некоторых заболеваний: хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфома, пролимфоцитарный лейкоз, лимфома из мантийных клеток, фолликулярная лимфома и лифмома маргинальной зоны, а также волосковоклеточный лейкоз (5, 6).

Оценка соотношения легких цепей каппа/лямбда также важна для различения вторичного гиперлимфоцитоза и лимфопролиферативных синдромов (5). Обычно в В-вторичных популяциях соотношение каппа/лямбда составляет от 1/1 до 2/1, в то время как в клональных В-пролиферациях оно обычно превышает 3/1.

Иногда поступали сообщения о клональных популяциях В-клеток в нелимфоматозных процессах в увеличенных реактивных лимфатических узлах и связанных со слизистой лимфоидных популяциях клеток. Эти, в основном небольшие, клоны считаются незлокачественными пролиферациями В-лимфоцитов, определяемыми аномальным ответом на стимуляцию бактериальным или вирусным антигеном (7). Описывались состояния биклональность или бифенотипа при CLL и других лимфопролиферативных заболеваниях (8).

Анализ клональности как часть иммунофенотипического профилирования многопараметрической проточной цитометрией всегда следует оценивать совокупно с другими результатами испытаний (морфологическая цитогенетика, молекулярные маркеры) и клиническими особенностями для правильной классификации каждой нозологической единицы (5, 8, 9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Реагент селекции (например, CD19-APC-Alexa 750, REF A94681)
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОТМЫВКОЙ

Примечание. Не ссылайтесь на инструкции для лизирующего реагента. Следуйте рекомендованному методу, описанному ниже.

1. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок.
2. Добавьте в каждую пробирку по 3 мл PBS.
3. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
4. Удаляют супернатант аспирацией.
5. Затем выполняют лизис эритроцитов, например, при желании использовать VersaLyse (REF A09777), следуют приводимой ниже методике.
6. Добавляют 1 мл фиксирующей и лизирующей смеси «Fix-and-Lyse», приготовленной для немедленного применения путем смешивания 1 мл VersaLyse + 0,025 мл фиксирующего раствора IOTest3 10x Fixative Solution (REF A07800).
7. Немедленно перемешивают на вортексе от 1 до 2 секунд и инкубируют в течение 10 минут при комнатной текмпературе, защищая от света.
8. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
9. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией, добавляют по 3 мл PBS в каждую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Повторяют этапы 8 и 9.
11. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
12. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя 0,1 мл PBS
13. Добавляют подходящий объем реагента селекции конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку
14. Добавляют 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку. Немедленно перемешивают на вортексе от 1 до 2 секунд
15. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
16. Добавьте в каждую пробирку по 3 мл PBS.
17. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
18. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

    0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

    0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

    Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Цепь каппа (к) — полипептид длиной 25 Kd, получаемый при папаиновом расщеплении молекулы IgG, кодированной локусом каппа человеческого иммуноглобулина (IGK) на 2 хромосоме (10). Структура субъединиц IgG представляет собой 2 легких цепи и 2 тяжелых цепи. Каждая легкая цепь состоит из двух тандемных иммуноглобулиновых доменов: a) одного вариабельного домена (VL) и b) одного постоянного (CL) домена. В то время как VL демонстрирует значительное разнообразие последовательностей, CL демонстрирует внутреннюю гомологию с повторяющимися единицами.

Анти-каппа поликлональные антитела распознают легкую каппа-цепь иммуноглобулинов, экспрессированную на поверхности клеточной субпопуляции, составляющей примерно 2/3 зрелых B-лимфоцитов периферической крови. Эта легкая цепь также обнаруживается на поверхности субпопуляции незрелых B-лимфоцитов костного мозга (11).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (12). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD19/Kappa-FITC	2,0 cells /µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD19/Kappa-FITC	10	57,64	58,86	0,98	1,80	1,69	3,06

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификация компонента 1	Спецификация компонента 2
Специфичность	Not Applicable	Not Applicable
Клон	679.1Mc7	7T4-1F5
Гибридома	X63 x balb/c	NS1 x balb/c
Иммуноген	Non Biological Hapten	A unique clonotypic determinant present on the cell line used for immunization
Иммуноглобулин	IgG1	IgG2a
Вид	Мышь	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	FITC / Ig: 2,5 - 5	PE / Ig : 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm	488 nm
Пик эмиссии	525 nm	575
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3	

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-FITC / IgG2a(mouse)-PE

REF B49179 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Эта смесь мышиного изотипического контроля IgG1-FITC / IgG2a-PE из линии IOTest подходит для анализа проточной цитометрии проб крови человека. Она позволяет оценить неспецифическую часть окрашивания, полученного на лейкоцитах со специфическими антителами изотипа IgG1, конъюгированными с FITC и /или антителами к изотипу IgG2a, конъюгированными с PE и принадлежащими к линии IOTest.

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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данная смесь изотипических контролей из серии реактивов IOTest служит для определения неспецифического окрашивания моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) и R-фикоэритрином (ФЭ), из серии реактивов IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфическая комбинация антител, конъюгированных с ФИТЦ и ФЭ, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавить 20 мкл изотипического контроля IOTest в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

   Удалите супернатант путем аспирации и перерастворите клеточную массу, используя 0,5 мл PBS. Пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к изотипическому подклассу IgG1, не фиксируется специфическим образом к каким-либо из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов человека

Моноклональное антитело 7T4-1F5, принадлежащее к изотипическому подклассу IgG2a, не фиксируется специфическим образом к каким-либо из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов человека.

ПРЕДЕЛ БЛАНКА С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Исследование было проведено в соответствии с CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Оценка способности обнаружения для методик измерения клинической лаборатории; утвержденное руководство — второе издание) (3). Предел бланка (LOB) — наибольший результат измерения, который может наблюдаться (с заявленной вероятностью) для пробы бланка. В таблице ниже показан предел бланка (в клетках на мкл) для каждой испытуемой популяции:

Испытуемая популяция	Предел бланка
Лимфоциты IgG1-FITC	1 cell/µL
Лимфоциты IgG2a-PE	4 cells/µL
Моноциты IgG1-FITC	1 cell/µL
Моноциты IgG2a-PE	0 cell/µL
Гранулоциты IgG1-FITC	1 cell/µL
Гранулоциты IgG2a-PE	2 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевые клетки Отрицательный	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты IgG1-FITC-	10	99,99	99,97	0,01	0,02	0,01	0,02
Моноциты IgG1-FITC-	10	99,95	99,97	0,07	0,05	0,07	0,05
Гранулоциты IgG1-FITC-	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Лимфоциты IgG2a-PE-	10	100,00	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01
Моноциты IgG2a-PE-	10	99,90	99,95	0,11	0,07	0,11	0,07
Гранулоциты IgG2a-PE-	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (4).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (5).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	HLA-DR
Клон	Immu-357
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	EBV-transformed cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-HLA-DR-PC7

REF B49180 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих HLA-DR антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула HLA-DR представляет собой полезный индикатор для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании в рамках расширенной панели иммунофенотипирования. Анализ экспрессии антигена HLA-DR позволяет определить бластные клетки миелоидного происхождения. Их часто наблюдаемый фенотип: HLA-DR+ CD7– CD45 слабый. Однако гипергранулярные лейкозы промиелоцитарного типа (подгруппа LAM-M3) характеризуются слабой экспрессией индикатора HLA-DR или ее полным отсутствием (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реагент для лизиса эритроцитов с этапом промывки после лизиса. Например, реагентная система IMMUNOPREP (см. 7546999).
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Процедура с IMMUNOPREP (без промывочного раствора)

Примечание. Не ссылайтесь на инструкции для лизирующего реагента. Следуйте рекомендованному методу, описанному ниже.

Эта процедура относится только к рабочей станции для подготовки проб TQ-Prep

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Добавьте 100 мкл тестовой пробы в каждую пробирку. Осторожно перемешайте пробирку в течение 1–2 секунд
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Загружайте тестовые пробирки по часовой стрелке в съемную карусель. Поместите карусель в блок индексации TQ-Prep. Закройте крышку карусели.
5. Нажмите кнопку RUN (ЗАПУСК), чтобы начать автоматическую обработку пробы

   ПРИМЕЧАНИЕ. В обязательном порядке защищайте подготавливаемые материалы от солнечного света, храните их при температуре от 2 до 8°C и анализируйте в течение 24 ч.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело Immu357 распознает эпитоп, который переносится на мономорфном белке в 29 – 33 kDa, идентифицируемый как HLA-DR. Система HLA (антиген лейкоцитов человека) – название главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Зашифрованные 5 локусами (DM, DO, DP, DQ и DR) локуса D молекулы HLA класса II также называют антигенами HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (2,3). Экспрессия антигенов класса II ограничена антиген-презентирующими клетками, то есть B-лимфоцитами, моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса кожи (3,4). На тимоцитах антиген HLA-DR экспрессируется только после активации (5). Стволовые клетки и кроветворные клетки-предшественники экспрессируют его до определенной стадии своей дифференциации (3,6).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (7). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты HLA-DR-PC7 +	14 cells/µL
Моноциты + HLA-DR-PC7	7 cells/µL

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С IMMUNOPREP (БЕЗ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА)

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + HLA-DR-PC7	15 cells/µL
Моноциты + HLA-DR-PC7	8 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + HLA-DR-PC7	10	70,81	39,38	1,2	1,05	1,7	2,66
Моноциты + HLA-DR-PC7	10	86,02	97,68	1,61	0,36	1,87	0,36

ТОЧНОСТЬ С IMMUNOPREP (БЕЗ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА)

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + HLA-DR-PC7	10	40,81	30,68	1,25	0,54	3,05	1,75
Моноциты + HLA-DR-PC7	10	96,69	94,15	0,41	0,54	0,42	0,58

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human cytotoxic T-lymphocyte clone (HLA A2)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD8-APC-Alexa Fluor 700

REF B49181 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD8 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Т-клетки CD8+ традиционно классифицируются как Т-лимфоциты Т-клеток/цитотоксические Т-клетки. Анализ популяции лимфоцитов CD8+ с помощью проточной цитометрии является очень эффективным компонентом при определении ранее не исследованных различных функциональных поднаборов памяти, цитотоксических препаратов и функциональных поднаборов эффекторов. Таким образом, оценка CD8 является очень полезной для оценки компетентности Т-клеток и изменяется под воздействием множества факторов иммунодефицита, аутоиммунных состояний и неоплазии, в частности лейкемии, вызываемой Т-клетками, и лимфом.

Кратковременное распространение популяции Т-клеток CD8+ Т обычно происходит на раннем этапе заражения ВИЧ. Считается, что эти популяции роста клеток CD8+ способны содействовать нецитотоксичному подавлению репликации ВИЧ. Постоянное распространение этой популяции наблюдается при двух связанных условиях: синдром диффузного инфильтративного лимфоцитоза (СДИЛ) и связанный с ВИЧ синдром лимфоцитоза CD8+ (1,2). CD8 является маркером Т-клеток, который часто проявляется вместе с CD4 и распознается в большинстве Т-клеточных злокачественных опухолях, например при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и анапластической крупноклеточной лимфоме (3).

Т-клеточный лейкоз взрослых достаточно часто присутствуют в организме не проходящих лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающим фенотипом CD4+. С другой стороны наблюдалось резкое увеличение самопроизвольного распространения опухоли, что преобладает с лимфоцитами CD8+ у пациентов NHIH. Таким образом, размножение клона HTLV-1 положительных лимфоцитов CD8+ и CD4+ происходит с использованием двух разных механизмов. Поэтому инфекция HTLV-1 устанавливает предлейкозный фенотип, который ограничен инфицированными CD4+ клонами (4).

Т-клетки CD8+ Т участвуют в инициации, распространении и регулировании нескольких патогенных аутоиммунных реакций. Аутореактивные Т-клетки CD8+ также могут обеспечивать аутоиммунитет, секретируя цитокины, способные повышать восприимчивость целевых клеток к цитотоксичности, или секретируя хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в область аутоиммунитета. Кроме того, было выявлено, что аутореактивные Т-клетки CD8+ уменьшают аутоиммунные реакции. Т-клетки CD8+ участвуют в патогенезе не менее чем 30 аутоиммунных нозологических единиц в основном за счет цитотоксического воздействия на различные целевые клетки (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79391).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD8 является димером с дисульфидной связью, который существует либо в виде гомодимера CD8α, либо в виде гетеродимера CD8αβ. CD8β необходим для поверхностной экспрессии CD8α. Молекулярный вес каждого мономера α и β составляет примерно 32–34 kDa (6, 7). CD8 связывается с неполиморфным доменом (α3-доменом) молекул MHC класса I (8). Молекула CD8 присутствует в поднаборе Т-клеток лимфоцитов периферийной крови человека. Поднабор NK-клеток экспрессирует антиген CD8, но с малой и средней плотностью экспрессии (9).

Гомодимер CD8α экспрессируется NK-клетками и Т-клетками γδ+. CD8 также присутствует в большинстве тимоцитов, где он часто коэкспрессирует с CD4, а также в субпопуляции костномозговых клеток. Молекула CD8 взаимодействует с рецептором Т-клетки (TCR) в качестве корецептора для антигенраспознающей клетки, ограниченной MHC класса I (10, 11). CD8 широко используется как маркер цитотоксических Т-лимфоцитов.

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (12).

B9.11 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD8 на первом International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека), который проводился в Paris, Франция, в 1982 г. (13, 14)

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD8-APCA700 +	4,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD8-APCA700	10	37,21	24,28	0,71	0,67	1,90	2,76

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.
8. На субпопуляции лимфоцитов может происходить слабое неспецифичное связывание некоторых доноров с конъюгатами APC-Alexa Fluor 700.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human cytotoxic T-lymphocyte clone (HLA A2)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 6,1-8,7
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD8-Pacific Blue

REF B49182 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD8 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Т-клетки CD8+ традиционно классифицируются как Т-лимфоциты Т-клеток/цитотоксические Т-клетки. Анализ популяции лимфоцитов CD8+ с помощью проточной цитометрии является очень эффективным компонентом при определении ранее не исследованных различных функциональных поднаборов памяти, цитотоксических препаратов и функциональных поднаборов эффекторов. Таким образом, оценка CD8 является очень полезной для оценки компетентности Т-клеток и изменяется под воздействием множества факторов иммунодефицита, аутоиммунных состояний и неоплазии, в частности лейкемии, вызываемой Т-клетками, и лимфом.

Кратковременное распространение популяции Т-клеток CD8+ Т обычно происходит на раннем этапе заражения ВИЧ. Считается, что эти популяции роста клеток CD8+ способны содействовать нецитотоксичному подавлению репликации ВИЧ. Постоянное распространение этой популяции наблюдается при двух связанных условиях: синдром диффузного инфильтративного лимфоцитоза (СДИЛ) и связанный с ВИЧ синдром лимфоцитоза CD8+ (1,2). CD8 является маркером Т-клеток, который часто проявляется вместе с CD4 и распознается в большинстве Т-клеточных злокачественных опухолях, например при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и анапластической крупноклеточной лимфоме (3).

Т-клеточный лейкоз взрослых достаточно часто присутствуют в организме не проходящих лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающим фенотипом CD4+. С другой стороны наблюдалось резкое увеличение самопроизвольного распространения опухоли, что преобладает с лимфоцитами CD8+ у пациентов NHIH. Таким образом, размножение клона HTLV-1 положительных лимфоцитов CD8+ и CD4+ происходит с использованием двух разных механизмов. Поэтому инфекция HTLV-1 устанавливает предлейкозный фенотип, который ограничен инфицированными CD4+ клонами (4).

Т-клетки CD8+ Т участвуют в инициации, распространении и регулировании нескольких патогенных аутоиммунных реакций. Аутореактивные Т-клетки CD8+ также могут обеспечивать аутоиммунитет, секретируя цитокины, способные повышать восприимчивость целевых клеток к цитотоксичности, или секретируя хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в область аутоиммунитета. Кроме того, было выявлено, что аутореактивные Т-клетки CD8+ уменьшают аутоиммунные реакции. Т-клетки CD8+ участвуют в патогенезе не менее чем 30 аутоиммунных нозологических единиц в основном за счет цитотоксического воздействия на различные целевые клетки (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD8 является димером с дисульфидной связью, который существует либо в виде гомодимера CD8α, либо в виде гетеродимера CD8αβ. CD8β необходим для поверхностной экспрессии CD8α. Молекулярный вес каждого мономера α и β составляет примерно 32–34 kDa (6, 7). CD8 связывается с неполиморфным доменом (α3-доменом) молекул MHC класса I (8). Молекула CD8 присутствует в поднаборе Т-клеток лимфоцитов периферийной крови человека. Поднабор NK-клеток экспрессирует антиген CD8, но с малой и средней плотностью экспрессии (9).

Гомодимер CD8α экспрессируется NK-клетками и Т-клетками γδ+. CD8 также присутствует в большинстве тимоцитов, где он часто коэкспрессирует с CD4, а также в субпопуляции костномозговых клеток. Молекула CD8 взаимодействует с рецептором Т-клетки (TCR) в качестве корецептора для антигенраспознающей клетки, ограниченной MHC класса I (10, 11). CD8 широко используется как маркер цитотоксических Т-лимфоцитов.

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (12).

B9.11 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD8 на первом International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека), который проводился в Paris, Франция, в 1982 г. (13, 14)

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD8-Pacific Blue +	2,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD8-Pacific Blue	10	25,51	30,82	1,21	0,42	4,75	1,36

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD7
Клон	8H8
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD7-PC7

REF B49183 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD7 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии антигена CD7 в качестве индикатора Т-линии в сочетании с экспрессией антигенов CD3 и CD5 полезен для диагностики пролиферативных синдромов Т-клеток, например, острых лимфобластных лейкозов (T-ALL) и пролимфоцитарных лейкозов Т-клеток (1,2,3,4). Их использование параллельно с другими миелоидными маркерами (миелопероксидаза и CD33), а также маркерами В-линии (CD79 и CD19) позволяет идентифицировать более 98% острых лейкозов (1). Антиген CD7 может экспрессироваться определенными острыми незрелыми миелоидными лейкозами (AML) (1). Использование методов измерения было предложено для классификации острых бифенотипических лейкозов (5). В этом контексте антиген CD7 считается скорее индикатором недифференцированной природы новообразования, а не маркером Т-линии (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с PC7, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD7 является мономерным трансмембранным гликопротеином с молекулярным весом 40 кДа. Дистальная внеклеточная часть этого белка включает уникальный участок типа «вариабельной области иммуноглобулина».

Молекула CD7 экспрессируется рано в онтогенезе Т-клеток (внетимусная протимоцитная стадия) и сохраняется до стадии зрелых Т-клеток лимфоцитов (6,7,8). Антиген CD7 присутствует в тимоцитах, на большинстве циркулирующих Т-клеток лимфоцитов, на NK-клетках, на подгруппе популяции пре-В лимфоцитов, на В-клетках лимфоцитов, происходящих из эмбрионального костного мозга, а также на кроветворных плюрипотентных стволовых клетках (9,10). С другой стороны, зрелые В-клетки лимфоцитов и клетки эритроцитарного, миелоидного и мегакариоцитарного происхождения не экспрессируются CD7 (6,10). Моноклональное антитело 8H8.1 было отнесено к CD7 во время 2-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1984 году (код WS: 38, секция T) (11).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (12). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD7-PC7 +	9,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD7-PC7	10	73,33	74,28	0,59	0,91	0,80	1,22

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).

   При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).
6. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD16
Клон	3G8
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human neutrophils
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD16-APC
-Alexa Fluor 750

REF B49184 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD16 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD16 остается важнейшим индикатором для определения подгрупп популяций «природных клеток-киллеров» при злокачественных заболеваниях крови, трансплантациях, аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитах, а также для идентификации различных функциональных популяций NK в реакциях на воспаление и микробные инфекции (1,2).

При злокачественных заболеваниях кроветворной системы экспрессия CD16 на определенных типах клеток лейкемии имеет значение при определении прогноза (3,4). Популяция, определенная как T NK-подобные клетки CD16+, оказывается полезной при определении активности болезни при некоторых типах CLL (5). Важно то, что недавние клинические исследования выявили, что CD16 является потенциальным кандидатом для разработки новой иммунотерапии для борьбы с лейкемией B-клеток и AML на основе клеток (6,7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены в течение 24 часов после венепункции, с использованием процедуры, описанной выше на пробах, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD16 представляет собой низкоаффинный рецептор IgG (FcγRIII), связывающий иммунные комплексы, но не мономерный IgG. Антиген CD16 существует в двух различных формах, зашифрованных в двух различных генах: FcγRIIIA (или III-2) и FcγRIIIB (или III-1). Генетическая гетерогенность CD16 приводит к появлению альтернативных молекул, связанных с мембраной. Одна из них – трансмембранная форма (FcγRIIIA, 50 – 65 kDa), экспрессированная на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Другая — форма, связанная с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) (FcγRIIIB, 48 kDa), экспрессируемая только на нейтрофилах (8,9).

Было показано, что антиген CD16 не может быть нековалентно связан в мембране NK-клеток с цепью 16 kDa CD3ζ (10) или с двумерной цепью FcRγ (11). Моноклональное антитело 3G8 (mAb) связывается с FcγRIIIA, а также с FcγRIIIB (сильно). Было показано, что оно почти полностью блокирует связывание димеров IgG с FcγRIIIB (12). Эксперименты, в которых к молекуле FcγRIIIB были применены аминокислотные мутации, показали, что на 3G8 mAb оказывают влияние замены Lys162 и Val164 в цикле FG проксимального по отношению к мембране области молекулы, похожей на Ig (13). 3G8 mAb была присвоена CD16 во время Пятого семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1993 году (14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD16-APC-A750 +	2,0 cells/µL
Гранулоциты CD16-APC-A750 +	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD16-APC-A750	10	14,52	10,52	0,59	0,61	4,07	5,82
Гранулоциты + CD16-APC-A750	10	86,60	83,72	0,56	0,89	0,65	1,06

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD64
Клон	22
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate
концентрация	FITC / Ig: 4,0 - 6,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD64-FITC

REF B49185 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD64 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Экспрессия CD64 активированных полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯ) считается одним из наиболее достоверных маркеров для распознавания тяжелых инфекций/сепсиса (1, 2). Раннее определение сепсиса является очень важным для оказания своевременного лечения и улучшения прогноза (3). Экспрессия CD64 на нейтрофилах существенно увеличивается у новорожденных с сепсисом и является очень эффективным маркером для ранней диагностики неонатальной инфекции (4). Несколько групп уже приняли проточный цитометр в качестве средства диагностики для раннего выявления сепсиса с использованием CD64 на нейтрофилах у новорожденных в качестве биомаркера (5, 6).

Более того, сочетание CD64 с другими маркерами сепсиса, например IL-10, IL6, CRP и Ca, повышают чувствительность и специфическую прогностическую ценность (7, 8, 9). CD64 также был указан в качестве маркера для мониторинга активности инфекции нетуберкулезными бактериями у пациентов с ревматоидным артритом (10). Недавно CD64 был объявлен новой целью для специального лечения хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML) и острой миеломоноцитарного лейкоза (AMML), и его экспрессия коррелируется с типичными поверхностными маркерами этих заболеваний. Специфические для CD64 фитолитические рекомбинантные белки человека (CFP), которые являются химерными белками, убивают клетки CMML и AMML ex vivo.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА С РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07795).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD64 является интегральным мембранным гликопротеином, который также является Fc-рецептором, который связывает высокоаффинные мономерные антитела типа IgG (11). Он также называется Fc-гамма рецептором 1 (FcγRI) или FCRI. После связывания IgG CD64 взаимодействует с гамма-цепью и запускает активацию клеток (12). С точки зрения структуры, CD64 состоит из сигнального пептида, что позволяет передавать его на поверхность клетки, трех внеклеточных иммуноглобулиновых доменов типа C2, которые используются для связывания антитела, гидрофобного трансмембранного домена и короткого цитоплазматического фрагмента (13).

CD64 постоянно встречается в макрофагах и моноцитах. CD64 экспрессирован в ранних миелоидных клетках, а также в ПМЯ, активированных IFNγ и G-CSF (13, 14). Моноклональное антитело 22 было отнесено к кластеру CD64 дифференцирования на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцирующему антигену лейкоцитов человека, который проводился в Вене, Австрия в 1989 г. (код WS: 96, секция: M) (15).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (16). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD64-FITC	2,0 cells/µL
Гранулоциты + CD64-FITC	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + CD64-FITC	10	99,43	99,43	0,67	0,35	0,67	0,35
Гранулоциты + CD64-FITC	10	100,00	100,00	0,01	0,00	0,01	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD64
Клон	22
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD64-PC5

REF B49186 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD64 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Экспрессия CD64 в активированных полиморфно-ядерных лейкоцитов (PMN) считается одним из наиболее достоверных маркеров для распознавания тяжелых инфекций/сепсиса (1,2). Раннее определение сепсиса является очень важным для оказания своевременного лечения и оптимизации выживаемости (3). Экспрессия CD64 на нейтрофилах существенно увеличивается у новорожденных с сепсисом и является очень эффективным маркером для ранней диагностики неонатальной инфекции одним определением, по сравнению с другими воспалительными маркерами (4). Несколько групп уже приняли проточный цитометр в качестве средства диагностики для раннего выявления сепсиса с использованием CD64 на нейтрофилах у новорожденных в качестве биомаркера (5,6).

Более того, исследования показали, что сочетание нейтрофилов CD64 с другими маркерами сепсиса, например IL-10, IL-6, CRP и прокальцитонин, повышают чувствительность и специфическую прогностическую ценность (7,8,9). Нейтрофил CD64 был указан в качестве маркера для мониторинга активности инфекции нетуберкулезными микобактериями (NTM) у пациентов с ревматоидным артритом (10). Кроме того, экспрессия CD64 на нейтрофилах и моноцитах была показана как маркер при диагностировании пациентов с периодической лихорадкой, афтозным стоматитом, фарингитом и шейным аденитом (PFAPA), вместе с другими аутовоспалительными заболеваниями, демонстрирующими периодическую лихорадку, и бактериальными инфекциями (11). Позднее сообщалось, об использовании CD64 как новой мишени для лечения хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML) и острого миеломоноцитарного лейкоза (AMML) (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07798).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены в течение 24 часов после венепункции, с использованием процедуры, описанной выше на пробах, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD64 является интегральным мембранным гликопротеином, который также является Fc-рецептором, который связывает высокоаффинные мономерные антитела типа IgG (13). Он также называется Fc-гамма рецептором 1 (FcγRI) или FCRI. После связывания IgG CD64 взаимодействует с гамма-цепью и запускает активацию клеток (14). С точки зрения структуры, CD64 состоит из сигнального пептида, что позволяет передавать его на поверхность клетки, трех внеклеточных иммуноглобулиновых доменов типа C2, которые используются для связывания антитела, гидрофобного трансмембранного домена и короткого цитоплазматического фрагмента (15).

CD64 постоянно встречается в макрофагах и моноцитах. CD64 экспрессирован в ранних миелоидных клетках, а также в ПМЯ, активированных IFNγ и G-CSF (15, 16). Моноклональное антитело 22 было отнесено к кластеру CD64 дифференцирования на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцирующему антигену лейкоцитов человека, который проводился в Вене, Австрия в 1989 г. (код WS: 96, секция: M) (17).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD64-PC5	4,0 cells/µL
Гранулоциты CD64-PC5 +	11,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + CD64-PC5	10	97,21	97,82	0,55	0,84	0,56	0,86
Гранулоциты + CD64-PC5	10	100,00	99,99	0,00	0,01	0,00	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип, COULTER, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios, VersaLyse являются торговыми марками компании Beckman Coulter, Inc. и зарегистрированы в Бюро по патентам и товарным знакам США (USPTO).

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD59
Клон	P282E
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human red cells
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4 - 7
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD59-FITC

REF B49187 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD59 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

CD59 — находящийся на поверхности клеток ингибитор мембраноатакующего комплекса (MAC) на клетках человека. Он широко распространен и присутствует в большинстве тканей и на всей циркулирующих клетках. CD59 регулирует комплемент-опосредованный лизис клеток и участвует в передаче сигнала у лимфоцитов. Проточная цитометрия является наиболее чувствительным количественным методом определения экспрессии CD59 на клеточной поверхности нормальных и злокачественных клеток (1,2).

Мутации в гене CD59 вызывают дефицит CD59, заболевание, приводящее к гемолитической анемии и тромбозу. Мутации, влияющие на якоря гликозилфосфатидилинозита (GPI), такие как CD59, приводят к пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH) (3,4). Встречаемость «PNH-подобного» дефекта также была продемонстрирована при многих гематологических заболеваниях и в клетках периферической крови (PBC) здоровых людей (5,6,7,8,9,10,11).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. 6603855).
- Специфические антитела, конъюгированные с FITC, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 6603855).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Человеческий CD59 представляет собой небольшой (~19 kDa), сильно гликированный, глобулярный мембранный белок с GPI-якорем (12). Гликопротеин CD59, который также известен как MAC-ингибиторный белок (MAC-IP), мембранный ингибитор реактивного лизиса (MIRL), представляет собой белок, кодируемый у человека геном CD59. CD59 определяется как мембранно-ассоциированный C-регуляторный белок и входит в батарею ингибиторных белков, которая включая в себя молекулы с GPI-якорем CD55 и CD46. Эти белки защищают клетки от атак комплемента и возможного реактивного лизиса (1). CD59, по существу, ингибирует внедрение нескольких копий C9 в комплекс C5b678 во время атаки комплемента на мембрану клеток-хозяев. P282E был отнесен к кластеру дифференцирования CD59 на 5-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Boston, США, в 1993 г. (13).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (14). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD59-FITC	6,0 cells/µL
Моноциты + CD59-FITC	3,0 cells/µL
Гранулоциты + CD59-FITC	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD59-FITC	10	99,98	99,99	0,05	0,02	0,05	0,02
Моноциты + CD59-FITC	10	99,88	100,00	0,37	0,00	0,37	0,00
Гранулоциты + CD59-FITC	10	99,98	100,00	0,05	0,00	0,05	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD57
Клон	NC1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Cells from quail ciliary ganglia
Иммуноглобулин	IgM
Вид	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate
концентрация	FITC / Ig: 19 - 24
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD57-FITC

REF B49188 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD57 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
В периферической крови, CD57 выполняет роль NK-клетки (естественного киллера) лимфоцитов (1). Как маркер NK-клеток CD57 экспрессирует в поднаборах NK- и T-клеток (больших гранулярных лейкоцитах). Исследование экспрессии CD57 дает ценные сведения для различных вариантов клинического применения. Например, недостаточная экспрессия CD57 в NK- и T-клетках связана с функциональной незрелостью этих клеток и высокой подверженностью инфекциям (2, 3). Восстановление и лучшее приживление пуповинной крови после трансплантации связано с повторным появлением NK-клеток, экспрессирующих CD57 (4).

Лейкоз больших гранулярных лейкоцитов (ЛБГЛ) является одной из лучше распознаваемых форм NK-клеточного лейкоза. Несмотря на то, что гемапатологические свойства большинства видов T-клеточных ЛБГЛ являются уникальными, наиболее распространенным фенотипом является CD3+ CD4- CD8+ CD56- CD57+ (5, 6). Агрессивный NK-клеточный лейкоз (ANKL) является особенно инвазивной формой заболевания, которую следует отличать от других типов NK-клеточных и T-клеточных лимфом. Клинически он проявляется в виде сильной анемии и тромбоцитопении с постоянным фенотипом CD2+ CD3- CD4- CD56+ CD57- (7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. 6603877).
- Реагент селекции (например, CD3-APC-Alexa 750, REF A94680)
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАГЕНТА СЕЛЕКЦИИ

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавляют соответствующий объем реагента селекции конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую и контрольную пробирку.
3. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
4. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
6. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
7. Удаляют супернатант аспирацией.
8. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
9. Повторяют этап 6
10. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

    0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

    0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.
11. Удалите супернатант путем аспирации и перерастворите клеточную массу, используя 0,5 мл PBS. Пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD57, которая изначально называлась HNK- 1, представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 110–115 kDa. Молекула CD57 представляет собой олигосахаридное антигенное соединение с сульфурированными остатками глюкуроновой кислоты. Она связывается с различными полипептидами, липидами и хондроитинсульфат протеогликанами, присутствующими в различных тканях. Молекула CD57 экспрессирует в поднаборах кроветворных клеток, нейроэктодермальных клеток, нейроэндокринных клеток, длинной малоберцовой мышцы и простатического эпителия (8, 9, 10, 11).

Антиген CD57 был первоначально выявлен в кроветворных тканях большинства больших гранулярных лейкоцитов (БГЛ). У большинства взрослых антиген CD57 экспрессирует в поднаборе NK-клеток и положительных Т-лимфоцитов CD8 (10). Молекула CD57 экспрессирует в поднаборе костномозговых клеток и, вероятно, присутствует, в лимфоцитах пуповинной крови.

Поднабор Т-лимфоцитов CD4+ / CD45RO+ из герминативного центра лимфатического узла экспрессирует антиген CD57 (9, 10). Как показывают данные, молекула CD57 участвует в межклеточных взаимодействиях. Молекулы L-селектина (CD62L) и P-селектина (CD62P) могут являться возможными лигандами для CD57 (8, 12). Моноклональное антитело NC1 было отнесено к кластеру CD57 на 5-м Международном семинаре, посвященном дифференцирующему антигену лейкоцитов человека, который проводился в Бостоне, США в 1993 г. (13).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (14). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD3 / CD57	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD3 / CD57	10	9,01	5,36	0,33	0,41	3,61	7,60

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD56
Клон	N901
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human chronic myeloid leukemia (hCML) cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD56-PC5.5

REF B49189 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD56 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Моноклональные антитела N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, который экспрессируется большинством натуральных киллеров (NK-клеток) периферической крови (1,2), а также субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3). NK-клетки характеризуются собственной и специфической цитотоксической активностью, которая проявляется, когда нарушается равновесие ингибирующих сигналов от иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (ИРК) и активирующих сигналов от рецепторов естественной цитотоксичности (РЕЦ). Таким образом, когда ИРК узнают достаточное число молекул HLA I на поверхности клетки-мишени, они подают в NK-клетки сигнал, способный ингибировать лизис. Напротив, если число таких молекул HLA недостаточно (случай опухолевых или инфицированных вирусом клеток), литический сигнал от РЕЦ не ингибируется, что приводит к лизису клетки-мишени (4).

У здоровых людей среди примерно 15% от общего числа лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих антиген NKH-1, более 95% клеток обладают как неспецифической, так и специфической цитотоксической активностью. Этот реагент позволяет характеризовать клеточные популяции или субпопуляции с NK и/или цитотоксической активностью, ассоциированной с фенотипом CD56+. Он также позволяет изучать эти популяции при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (2), аутоиммунные состояния, гиперчувствительность, вирусные инфекции и восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа (5). Наконец, он может быть полезен при фенотипировании злокачественных дискразий крови, таких как лейкемии и лимфомы (6,7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Специфические антитела, конъюгированные с PC5,5, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A62833).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекулярная масса сильно гликированного белка CD56 (молекулы NKH1) составляет 200–220 kDa (1,3). Он экспрессирует на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, которые демонстрируют не ограниченную главным комплексом гистосовместимости цитотоксичность (1,2). Моноклональное антитело N901 (NKH-1) вступает в реакцию с большинством NK-клеток (1,3). Оно также вступает в реакцию с небольшой популяцией CD3-положительных Т-клеток, которая опосредует пониженную цитотоксическую активность (2). Это антитело не вступает в реакцию с моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами. Антитело N901 (NKH-1) было отнесено к кластеру дифференцирования CD56 на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (10).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD56-PC5,5 +	5,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD56-PC5,5	10	16,57	12,90	0,60	0,40	3,65	3,07

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD55
Клон	JS11KSC2.3
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	NA
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD55-PE

REF B49190 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD55 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

CD55, который также называют фактором ускорения распада комплемента (DAF), связывает C3bBb (конвертазу альтернативного пути) и C4b2a (конвертазу классического пути) для ускорения распада C3-конвертаз и, таким образом, защищает от несоответствующей активации комплемента (1). Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH) — редкое заболевание гематопоэтических стволовых клеток, характеризующееся соматической мутацией в гене PIGA, приводящей к снижению или утрате якорей гликозилфосфатидилинозитола (GPI), включая CD55 и CD59 на эритроцитах. Уровень дефицита GPI используется для классификации типов PNH: I типа (полный дефицит), II типа (частичный дефицит) и III типа (нормальный дефицит). Проточная цитометрия является методом выбора для лабораторной диагностики PNH. Был опубликован ряд рекомендаций, содержащих указания относительно панелей и стратегии селекции популяции клеток (2,3,4).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Специфические антитела, конъюгированные с PE, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD55/DAF — член семейства белков, контролирующих комплемент, которые также называются регуляторами активации комплемента (5). DAF — белок с якорем гликозилфосфатидилинозитола, обнаруживаемый на поверхности большинства клеток. Он диссоциирует связанные аутологичной клеткой C3-конвертазы, C4b2a и C3bBb, на ранней стадии каскада амплификации комплемента, тем самым защищая аутологичные клетки от атаки комплемента. Его внеклеточный регион содержит четыре коротких консенсусных повтора 60-аа (SCR), а за ним следует регион интенсивного O-гликозилирования 97-аа). Выявлено два сплайс-варианта CD55, или изоформы: CD55 (wt) намного более распространен (в среднем в 48 раз чаще), чем CD55(int7+), содержащих часть интрона 7 или весь интрон целиком. JS11KSC2.3 был отнесен к кластеру дифференцирования CD55 на VI международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Kobe (1996 г.), под названием JS 11 (6).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (7). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD55-PE	7,0 cells/µL
Моноциты + CD55-PE	1,0 cells/µL
Гранулоциты + CD55-PE	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD55-PE	10	99,86	99,79	0,08	0,04	0,08	0,04
Моноциты + CD55-PE	10	99,92	99,97	0,12	0,05	0,12	0,05
Гранулоциты + CD55-PE	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD5
Клон	BL1a
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from human thoracic duct
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD5-PC5.5

REF B49191 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD5 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD5 является многофункциональным рецептором, экспрессируемым в сочетании с антиген-специфическими рецепторами на лимфоциты T и B-1a. CD5 играет роль регулятора некроза клеток и рецептора подавления патоген-ассоциированных молекулярных паттернов.

CD5 является T-клеточный маркером, экспрессируемым в развившихся злокачественных B-клеточных новообразованиях и других B-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваниях. Экспрессия CD5 удобна для определения скрытых моноклональных T-клеточных лимфоцитозов и диагностирования T-клеточных новообразований без лейкоцитоза и без признаков неоплазии по клеточной морфологии. В континууме у нормальных политипичных B-клеток экспрессия CD5 постоянна преимущественно на более поздних этапах созревания и в развившихся B-клетках. Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 обеспечивает более точное различие между такими различными B-клеточными пролиферациями, как B-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, мелкоклеточные лимфомы (CD5+ CD23+CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5+CD23– CD19+) (1,2,3,4,5,6).

CD5 используется в дифференциальной диагностике целого ряда лимфом с экспрессией периферической крови (проявление лейкозов), например, a) CD5-положительной фолликулярной лимфомы, b) анализа на остаточную минимальную болезнь неходжкиновских лимфом B-клеточного пути (CD5+), c) CD5-положительной фолликулярной лимфомы; d) CD5-положительной (CD5+) диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL) e) лимфомы из клеток маргинальной зоны (SP-MZL). CD5 рассматривается как независимый ненадежный прогностический признак крайне агрессивной диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (7,8).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD10 позволяет определить характеристики различных случаев B-клеточной неоплазии (6), например, B-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозов, мелкоклеточные лимфом (CD5+CD10– CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5– CD10+ CD19+) (1,2). Этот анализ также позволяет отличить острые лимфобластные B-клеточные лейкемии (B-ALL) и острые лимфобластные пре-B-клеточные лейкемии (CD5– CD10+CD19+) от пролимфоцитарных лейкозов (CD5– CD10– CD19+) (3,9,10,11,12).

Хронический лимфолейкоз (CLL) характеризуется клональной экспансией B-клеток (CD5(+)CD23(+)) в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных тканях. Анализ уровня экспрессии генов и фенотипические исследования показывают, что хронический лимфолейкоз (CLL), возможно, развивается из B-клеток CD5(+), аналогичных тем, которые обнаружен в крови здоровых взрослых индивидов (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.

3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.

4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.

6. Удаляют супернатант аспирацией.

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов большинством тимоцитов и подгруппой популяции В-лимфоцитов (13,14,15). CD5 экспрессируется в подгруппе В-клеток, выделяющих IgM, из-за недостаточного объема терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) фермента, который появляется для подавления активации BSR, и, тем самым, снижает аутоиммунную реакцию. С другой стороны, Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD5, чем В-клетки. CD5 положительно регулируется в Т-клетках при сильной активации. В вилочковой железе имеется корреляция с экспрессией CD5 и интенсивностью взаимодействия Т-клеток по отношению к аутопептидам. Экспрессия CD5 не обнаружена в гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (15). Во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (Код WS: 520, раздел T) для CD5 было назначено моноклональное антитело BL1a (13,14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (16). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD5-PC5,5 +	7,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD5-PC5,5	10	82,34	77,17	0,48	0,72	0,58	0,93

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45RO
Клон	UCHL1
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Human IL-2 dependent T-cell line
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45RO-ECD

REF B49192 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD45RO антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD45 экспрессирует при большинстве лейколимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемические клоны. Различные изоформы CD45 имеют варьируемую степень экспрессии на лимфоидных или миелоидных клетках и являются специфичными для типа клетки и зависят от стадии дифференцировки, а также состояния активации клеток. У пациентов, инфицированных ВИЧ, отмечается более высокая восприимчивость субпопуляции Т-клеток памяти CD4+CD45RO+ к прикреплению (1) и репликации вируса (2). У пациентов, страдающих плоскоклеточной карциномой головы и шеи, эффекторные Т-клетки CD8+CD45RO–CD27+, которые присутствуют в кровотоке, чувствительны к апоптозу (3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены в течение 24 часов после венепункции, с использованием процедуры, описанной выше на пробах, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Общий антиген лейкоцитов (CD45) — трансмембранного типа белок тирозинфосфат, сильно гликированный, с пятью изоформами, экспрессирующийся в высоких концентрациях на ядросодержащих гематопоэтических клетках, от стволовых клеток до клеток памяти, за исключением мегакариоцита/тромбоцита и эритроидной серии. Изоформы CD45 (функционально похожие белки со схожей, но не идентичной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

последовательностью аминокислот), включая CD45RA, генерируются альтернативным сплайсингом мРНК экзонов 4 (CD45RA), 5 (CD45RB) и 6 (CD45RC), что приводит к изменениям во внеклеточном домене молекулы (4). Регуляторные Т-клетки CD45RA+ преобразуются в регуляторные Т-клетки CD45RO+ после активации (5,6). CD45RO присутствует в клетках памяти и активированных Т-клетках, гранулоцитах, моноцитах, макрофагах и кортикальных тимоцитах; в то время как большинства B- и NK-клеток являются отрицательными.

Моноклональное антитело UCHL1 было отнесено к CD45RO во время 4rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Vienna, Austria, в 1989 г. (код WS: N31, раздел: Non Lineage / Natural Killer (Без дифференцировки / натуральный киллер)) (7).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (8). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD45RO-ECD	2 cells/µL
Моноциты + CD45RO-ECD	1 cell/µL
Гранулоциты CD45RO-ECD +	2 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD45RO-ECD	10	54,68	65,08	0,67	0,74	1,22	1,14
Моноциты + CD45RO-ECD	10	99,51	99,63	0,38	0,19	0,38	0,20
Гранулоциты + CD45RO-ECD	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45RA
Клон	2H4LDH11LDB9 (2H4)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T lymphocyte derived from Aotus trivirgatus
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45RA-ECD

REF B49193 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD45RA антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD45 экспрессирует при большинстве лейколимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемические клоны. Различные изоформы CD45 имеют варьируемую степень экспрессии на лимфоидных или миелоидных клетках и являются специфичными для типа клетки и зависят от стадии дифференцировки, а также состояния активации клеток. В клетках костного мозга лейкоциты, не являющиеся Т- или В-лейкоцитами, являются CD45RA-RO–. CD45RA экспрессирует в наивных / покоящихся Т-клетках и медуллярных тимоцитах и полезен для дифференциации наивных Т-клеток (CD45RA+) из Т-клеток памяти (CD45RO+).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07797).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Общий антиген лейкоцитов (CD45) — трансмембранного типа белок тирозинфосфат, сильно гликированный, с пятью изоформами, экспрессирующийся в высоких концентрациях на ядросодержащих гематопоэтических клетках, от стволовых клеток до клеток памяти, за исключением мегакариоцита/тромбоцита и эритроидной серии. Изоформы CD45 (функционально похожие белки со схожей, но не идентичной последовательностью аминокислот), включая CD45RA, генерируются альтернативным сплайсингом мРНК экзонов 4 (CD45RA), 5 (CD45RB) и 6 (CD45RC), что приводит к изменениям во внеклеточном домене молекулы (1). Внеклеточный домен CD45 обладает высокой степенью полиморфизма, и экспрессия изоформ связана с аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, что делает CD45 важным иммуномодулятором со значительным влиянием на бремя болезни (2).

CD45RA также называется рецептором белка тирозинфосфатазы типа C, и больший процент его экспрессируется как CD45RA T-хелперы в пуповинной крови, чем в крови взрослого человека (3, 4).

Моноклональное антитело 2H4LDH11LDB9 (2H4) оценивалось во время семинаров 3rd и 4th HLDA workshop on Human Leukocyte Differentiation (3-й и 4-й семинары по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) в Oxford (1986 г.) и Vienna (1989 г.) соответственно (5). Моноклональное антитело 2H4LDH11LDB9 (2H4) ограничено антигеном CD45RA (6, 7).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (8). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD45RA-ECD +	2,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD45RA-ECD	10	72,82	76,80	1,27	1,38	1,74	1,80

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45RA
Клон	2H4LDH11LDB9 (2H4)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T lymphocyte derived from Aotus trivirgatus
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45RA-APC
-Alexa Fluor 750

REF B49194 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD45RA антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD45 экспрессирует при большинстве лейколимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемические клоны. Различные изоформы CD45 имеют варьируемую степень экспрессии на лимфоидных или миелоидных клетках и являются специфичными для типа клетки и зависят от стадии дифференцировки, а также состояния активации клеток. В клетках костного мозга лейкоциты, не являющиеся Т- или В-лейкоцитами, являются CD45RA-RO–. CD45RA экспрессирует в наивных / покоящихся Т-клетках и медуллярных тимоцитах и полезен для дифференциации наивных Т-клеток (CD45RA+) из Т-клеток памяти (CD45RO+).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены в течение 24 часов после венепункции, с использованием процедуры, описанной выше на пробах, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Общий антиген лейкоцитов (CD45) — трансмембранного типа белок тирозинфосфат, сильно гликированный, с пятью изоформами, экспрессирующийся в высоких концентрациях на ядросодержащих гематопоэтических клетках, от стволовых клеток до клеток памяти, за исключением мегакариоцита/тромбоцита и эритроидной серии. Изоформы CD45 (функционально похожие белки со схожей, но не идентичной последовательностью аминокислот), включая CD45RA, генерируются альтернативным сплайсингом мРНК экзонов 4 (CD45RA), 5 (CD45RB) и 6 (CD45RC), что приводит к изменениям во внеклеточном домене молекулы (1). Внеклеточный домен CD45 обладает высокой степенью полиморфизма, и экспрессия изоформ связана с аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, что делает CD45 важным иммуномодулятором со значительным влиянием на бремя болезни (2).

CD45RA также называется рецептором белка тирозинфосфатазы типа C, и больший процент его экспрессируется как CD45RA T-хелперы в пуповинной крови, чем в крови взрослого человека (3, 4).

Моноклональное антитело 2H4LDH11LDB9 (2H4) оценивалось во время семинаров 3rd и 4th HLDA workshop on Human Leukocyte Differentiation (3-й и 4-й семинары по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) в Oxford (1986 г.) и Vienna (1989 г.) соответственно (5). Моноклональное антитело 2H4LDH11LDB9 (2H4) ограничено антигеном CD45RA (6, 7).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (8). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD45RA-APC-A750+	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD45RA-APC-A750+	10	54,63	82,04	0,68	0,64	1,24	0,78

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD43
Клон	DFT1
Гибридома	N/A
Иммуноген	Myeloblastic KG1 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD43-APC
-Alexa Fluor 750

REF B49195 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD43 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD43 — трансмембранный сиалогликопротеин, обычно производимый клетками крови, включая тимоциты, Т- и В-клетки (от гемацитобластов до плазматических клеток), за исключением покоящихся В-клеток. CD43 отображается только на подмножестве В-клеток и сохраняется на плазматических клетках (1, 2). CD43 также экспрессируется базофилами, эритроцитами, гранулоцитами, некоторыми моноцитами / макрофагами, NK-клетками и в слабой степени — мегакариоцитами/тромбоцитами. Функционально, CD43 служит лигандом для Е-селектина на Т-клетках и может регулировать Т-клеточный ответ и направленную миграцию. CD43 функционально вовлечен в стимуляцию роста человеческих В-клеток, предпочтительно на поздних стадиях В-клеточной дифференциации. Он играет как анти-адгезивные, так и про-адгезивные роли в роллинге нейтрофилов (3, 4, 5, 6).

CD43 присутствует при большинстве В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, включая ALL, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому/хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому из клеток мантии, лимфому Беркитта, предшественника В-лимфобластной лимфома, и подмножество В-клеточных лимфом маргинальной зоны. Доброкачественные В-клетки, как правило, не коэкспрессируют CD43 (7, 8). CD43 появляется как прогностический маркер в диффузной В-крупноклеточной лимфоме с плохим исходом для положительных на CD43 пациентов (9). CD43 обнаруживается в T/NK-клеточных лимфомах с переменной частотой. Корреляционные исследования с использованием методов проточной цитометрии и иммуноцитохимии продемонстрировали, что панель, содержащая MPO, CD3, CD20, CD43, CD56, CD68 и CD117, будет правильно идентифицировать случаи миелодных лейкозов в преобладающем большинстве случаев (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD43 (также известная как лейкосиалин, сиалофорин, сиалофорин лейкоцитов, gpL115) представляет собой гликопротеин муцинового типа с молекулярным весом 95–135 кДа, присутствующий на поверхности клеток. Молекула CD43 сильно O-гликирована и сиалилирована, что дает гетерогенный молекулярный вес (11, 12). Внеклеточный регион содержит обширное гликирование серина/треонина с конститутивным фосфорилированием на остатках серина во внутриклеточных областях. Растворимая форма CD43, получаемая в результате протеолизиса внеклеточных цепей, обнаруживается в плазме (13). Моноклональное антитело (mAb) DFT1 реагирует с внеклеточным эпитопом антигена CD43 (14).

Моноклональное антитело (mAb) DFT1 было отнесено к кластеру дифференцирования CD43 на семинаре 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigen (4-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (12).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD43-APC-A750 +	2,0 cells/µl
Моноциты + CD43-APC-A750	1,0 cells/µl
Гранулоциты + CD43-APC-A750	1,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD43-APC-A750	10	62,62	67,79	1,46	2,34	2,33	3,46
Моноциты + CD43-APC-A750	10	98,31	99,41	0,35	0,42	0,36	0,42
Гранулоциты + CD43-APC-A750	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD13
Клон	Immu103.44
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Mixture of cell lines KG-1a and TF1
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD13-PC5.5

REF B49196 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD13 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD13 представляет собой ранний индикатор миелоидной линейки. Экспрессия CD13 характерна для области клеток-предшественников костного мозга, он экспрессируется очень рано в процессе дифференциации миелоидной линии до того, как клетки демонстрируют какие бы то ни было морфологические признаки миелоидной дифференциации. Этот индикатор рекомендуется для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML) (1, 2). Рекомендуется одновременная оценка экспрессии других миелоидных маркеров (например, CD65, CD117, CD14, CD15, CD41, CD61, CD64 и гликофорин A) для классификации AML (3). Использование CD13 вместе с миелоидными маркерами (миелопероксидаза и CD33), маркерами B-клеток (CD79 и CD19) и маркерами T-клеток (CD3 и CD7) позволяет идентифицировать более 98% острых лейкозов (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A62833).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены в течение 24 часов после венепункции, с использованием процедуры, описанной выше на пробах, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD13, также известная N-аминопептидазой (APN), представляет собой трансмембранную металлопротеазу типа II с молекулярным весом в 150 – 170 kDa. Эта молекула имеет протяженную внеклеточную последовательность и короткую внутрицитоплазматическую область. Молекула CD13 связывает гомодимер нековалентным способом на поверхности клеток (4). Антиген CD13 экспрессируется рано в грануломоноцитарной линии (моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы) и их коммитированных клетках-предшественниках (промежуточные клетки-предшественники, образующие смешанные грануло-моноцитарные колонии или CFU-GM) (4), 5, 6, 7). Молекула CD13 также экспрессируется на клетках не кроветворных тканей, например на эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев, клетках, составляющих щеточную кайму кишечника, эндотелиальных клетках, фибробластах, стромальных клетках костного мозга, остеокластах и базальных клетках из желчных протоков (8). Моноклональное антитело Immu103.44 вступает в периферической крови в реакцию с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами. Оно было отнесено к CD13 во время 3-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (код WS: 285, секция M) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD13-PC5,5	5,0 cells/µL
Гранулоциты CD13-PC5,5 +	5,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Моноциты + CD13-PC5,5	10	94,68	97,88	0,79	0,54	0,83	0,56
Гранулоциты + CD13-PC5,5	10	99,99	99,91	0,02	0,03	0,02	0,03

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 6-7,8
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD4-Pacific Blue

REF B49197 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD4 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Этот реагент обеспечивает описание клеточных популяций лимфоцитов CD4+ при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие состояния иммунодефицита, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа. Последующее наблюдение и фенотипирование клеточных популяций CD4+ (3) при злокачественных дискразиях крови, таких как лейкемии и лимфомы.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Специфические антитела, конъюгированные с Pacific Blue, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (4). МАт 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (6). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD4-Pacific Blue +	2,0 cells/µL
Моноциты + CD4-Pacific Blue	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD4-Pacific Blue	10	32,22	47,01	0,57	0,67	1,78	1,43
Моноциты + CD4-Pacific Blue	10	88,04	87,61	0,55	1,45	0,63	1,66

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (7).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (8).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD38
Клон	LS198-4-3
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human T cell line HUT 78
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD38-PC7

REF B49198 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD38 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций лейкоцитов, экспрессирующих молекулу CD38 при заболеваниях иммунной системы, первоначально привели к повышенной экспрессии молекулы CD38 по отношению к активации клеток при иммунодефиците, вирусных инфекциях и B-клеточных новообразованиях (B-CLL и плазмоклеточная дискразия) (1,2,3,4). У больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV)/синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS) экспрессия CD38 на T-клетки связана с активацией клеток и потенциально полезна для анализа иммунологического статуса (5,6). Клиническая деятельность подтверждает, что клоны миеломных клеток действительно экспрессируют CD38 у большинства пациентов, хотя с различными значениями поверхностной плотности (7). Существует связь между экспрессией CD38 клетками CLL и более активным развитием болезни (8,9,10). CD38 экспрессируется у большинства более агрессивных с клинической точки зрения лейкозных клонов, требующих лечения (9,10). В настоящее время CD38 выбран в качестве основного средства для mAb-зависимой терапии (11)

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реагент для лизиса эритроцитов с этапом промывки после лизиса. Например, реагентная система IMMUNOPREP (см. 7546999).
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse
Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура с IMMUNOPREP (без промывочного раствора)

Примечание. Не ссылайтесь на инструкции для лизирующего реагента. Следуйте рекомендованному методу, описанному ниже.

Эта процедура относится только к рабочей станции для подготовки проб TQ-Prep

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мкл тестовой пробы в каждую пробирку. Осторожно перемешайте пробирку в течение 1–2 секунд
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Загружайте тестовые пробирки по часовой стрелке в съемную карусель. Поместите карусель в блок индексации TQ-Prep. Закройте крышку карусели.
5. Нажмите кнопку RUN (ЗАПУСК), чтобы начать автоматическую обработку пробы

   ПРИМЕЧАНИЕ. В обязательном порядке защищайте подготавливаемые материалы от солнечного света, храните их при температуре от 2 до 8°C и анализируйте в течение 24 ч.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD38, также называемый антигеном T10, представляет собой трансмембранный гликопротеин с одной цепью типа II, у которого цитоплазматическая конечная N-секция (1,12). Этот гликопротеин с молекулярным весом, близким к 45 kDa, экспрессируется в большом числе гемопоэтических клеток: его распределение зависит от этапа дифференциации и степени клеточной активации. Функциональная молекула представляет димер или мультимер (13,14,15). Одной из функций, которую первоначально приписывали CD38, является регуляция активации и пролиферации человеческих Т-лимфоцитов (5,6 и 16).

Лигирование CD38 агонистическими моноклональными антителами (mAb) вызывает быстрое выделение Ca2+ и запускает процесс фосфорилирования каскада интрацеллюлярный субстратов, что приводит к активации комплекса NF-κB (17,18). В слое В-клеток CD38 экспрессируется на высоких уровнях только костным мозгом с коммитированными клетками-предшественниками (ранние ВМ-клетки — CD38–) и В-лимфоцитами в герминативных центрах, плазмацитами на последней стадии дифференцировки и в активированных миндалинах (8,9,10). Напротив, зрелые девственные В-лимфоциты и В-лимфоциты памяти экспрессируют низкие уровни этой молекулы. Точнее говоря, на уровне лимфоцитарной дифференциации В-клеток экспрессия молекулы CD38 появляется на ранних этапах и исчезает во время созревания В-клеток, а затем снова появляется на финальном этапе дифференциации (плазмоцитарный этап).

Молекула CD38 экспрессируется активированными лимфоцитами Т- и В-клеток (19,20), моноцитами, большинством естественных клеток-убийц, медуллярными тимоцитами (21,22), а также в тромбоцитах (23) и эритроцитах (24). В циркулирующих лимфоцитах Т-клеток, обнаружена очень слабая экспрессия CD38. Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: T-CD38.06, раздел T) для CD38 было назначено моноклональное антитело LS198 (24).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (25). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD38-PC7 +	16 cells/µL
Моноциты + CD38-PC7	8 cells/µL
Гранулоциты CD38-PC7 +	10 cells/µL

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С IMMUNOPREP (БЕЗ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА)

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD38-PC7	15 cells/µL
Моноциты + CD38-PC7	10 cells/µL
Гранулоциты + CD38-PC7	11 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD38-PC7	10	67,24	5,91	1,91	0,35	2,84	5,97
Моноциты + CD38-PC7	10	99,36	98,24	0,31	0,44	0,31	0,45
Гранулоциты + CD38-PC7	10	99,98	99,93	0,02	0,08	0,02	0,08

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОЧНОСТЬ С IMMUNOPREP (БЕЗ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА)

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD38-PC7	10	44,84	4,69	1,17	0,12	2,62	2,56
Моноциты + CD38-PC7	10	97,37	97,8	0,65	0,64	0,67	0,65
Гранулоциты + CD38-PC7	10	99,72	99,35	0,1	0,46	0,1	0,47

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD38
Клон	LS198-4-3
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human T cell line HUT 78
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD38-PC5.5

REF B49199 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD38 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций лейкоцитов, экспрессирующих молекулу CD38 при заболеваниях иммунной системы, первоначально привели к повышенной экспрессии молекулы CD38 по отношению к активации клеток при иммунодефиците, вирусных инфекциях и B-клеточных новообразованиях (B-CLL и плазмоклеточная дискразия) (1,2,3,4). У больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV)/синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS) экспрессия CD38 на T-клетки связана с активацией клеток и потенциально полезна для анализа иммунологического статуса (5,6). Клиническая деятельность подтверждает, что клоны миеломных клеток действительно экспрессируют CD38 у большинства пациентов, хотя с различными значениями поверхностной плотности (7). Существует связь между экспрессией CD38 клетками CLL и более активным развитием болезни (8,9,10). CD38 экспрессируется у большинства более агрессивных с клинической точки зрения лейкозных клонов, требующих лечения (9,10). В настоящее время CD38 выбран в качестве основного средства для mAb-зависимой терапии (11)

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse
Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A62833).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD38, также называемый антигеном T10, представляет собой трансмембранный гликопротеин с одной цепью типа II, у которого цитоплазматическая конечная N-секция (1,12). Этот гликопротеин с молекулярным весом, близким к 45 kDa, экспрессируется в большом числе гемопоэтических клеток: его распределение зависит от этапа дифференциации и степени клеточной активации. Функциональная молекула представляет димер или мультимер (13,14,15). Одной из функций, которую первоначально приписывали CD38, является регуляция активации и пролиферации человеческих Т-лимфоцитов (5,6 и 16).

Лигирование CD38 агонистическими моноклональными антителами (mAb) вызывает быстрое выделение Ca2+ и запускает процесс фосфорилирования каскада интрацеллюлярный субстратов, что приводит к активации комплекса NF-кВ (17,18). В слое В-клеток CD38 экспрессируется на высоких уровнях только костным мозгом с коммитированными клетками-предшественниками (ранние ВМ-клетки — CD38–) и В-лимфоцитами в герминативных центрах, плазмацитами на последней стадии дифференцировки и в активированных миндалинах (8,9,10). Напротив, зрелые девственные В-лимфоциты и В-лимфоциты памяти экспрессируют низкие уровни этой молекулы. Точнее говоря, на уровне лимфоцитарной дифференциации В-клеток экспрессия молекулы CD38 появляется на ранних этапах и исчезает во время созревания В-клеток, а затем снова появляется на финальном этапе дифференциации (плазмоцитарный этап).

Молекула CD38 экспрессируется активированными лимфоцитами Т- и В-клеток (19,20), моноцитами, большинством естественных клеток-убийц, медуллярными тимоцитами (21,22), а также в тромбоцитах (23) и эритроцитах (24). В циркулирующих лимфоцитах Т-клеток, обнаружена очень слабая экспрессия CD38. Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: T-CD38.06, раздел T) для CD38 было назначено моноклональное антитело LS198 (24).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (25). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD38-PC5,5 +	11,0 cells/µL
Моноциты + CD38-PC5,5	4,0 cells/µL
Гранулоциты CD38-PC5,5 +	6,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD38-PC5,5	10	69,38	68,76	0,27	0,95	0,39	1,38
Моноциты + CD38-PC5,5	10	97,43	97,89	0,70	0,43	0,72	0,44
Гранулоциты + CD38-PC5,5	10	99,99	99,86	0,01	0,10	0,01	0,10

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванно 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD38
Клон	LS198-4-3
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human T cell line HUT 78
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD38-APC-Alexa Fluor 750

REF B49200 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD38 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций лейкоцитов, экспрессирующих молекулу CD38 при заболеваниях иммунной системы, первоначально привели к повышенной экспрессии молекулы CD38 по отношению к активации клеток при иммунодефиците, вирусных инфекциях и B-клеточных новообразованиях (B-CLL и плазмоклеточная дискразия) (1,2,3,4). У больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV)/синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS) экспрессия CD38 на T-клетки связана с активацией клеток и потенциально полезна для анализа иммунологического статуса (5,6). Клиническая деятельность подтверждает, что клоны миеломных клеток действительно экспрессируют CD38 у большинства пациентов, хотя с различными значениями поверхностной плотности (7). Существует связь между экспрессией CD38 клетками CLL и более активным развитием болезни (8,9,10). CD38 экспрессируется у большинства более агрессивных с клинической точки зрения лейкозных клонов, требующих лечения (9,10). В настоящее время CD38 выбран в качестве основного средства для mAb-зависимой терапии (11)

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD38, также называемый антигеном T10, представляет собой трансмембранный гликопротеин с одной цепью типа II, у которого цитоплазматическая конечная N-секция (1,12). Этот гликопротеин с молекулярным весом, близким к 45 kDa, экспрессируется в большом числе гемопоэтических клеток: его распределение зависит от этапа дифференциации и степени клеточной активации. Функциональная молекула представляет димер или мультимер (13,14,15). Одной из функций, которую первоначально приписывали CD38, является регуляция активации и пролиферации человеческих Т-лимфоцитов (5,6 и 16).

Лигирование CD38 агонистическими моноклональными антителами (mAb) вызывает быстрое выделение Ca2+ и запускает процесс фосфорилирования каскада интрацеллюлярный субстратов, что приводит к активации комплекса NF-кB (17,18). В слое В-клеток CD38 экспрессируется на высоких уровнях только костным мозгом с коммитированными клетками-предшественниками (ранние BM-клетки — CD38–) и В-лимфоцитами в герминативных центрах, плазмацитами на последней стадии дифференцировки и в активированных миндалинах (8,9,10). Напротив, зрелые девственные В-лимфоциты и В-лимфоциты памяти экспрессируют низкие уровни этой молекулы. Точнее говоря, на уровне лимфоцитарной дифференциации В-клеток экспрессия молекулы CD38 появляется на ранних этапах и исчезает во время созревания В-клеток, а затем снова появляется на финальном этапе дифференциации (плазмоцитарный этап).

Молекула CD38 экспрессируется активированными лимфоцитами Т- и В-клеток (19,20), моноцитами, большинством естественных клеток-убийц, медуллярными тимоцитами (21,22), а также в тромбоцитах (23) и эритроцитах (24). В циркулирующих лимфоцитах Т-клеток, обнаружена очень слабая экспрессия CD38. Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: T-CD38.06, раздел T) для CD38 было назначено моноклональное антитело LS198 (24).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (25). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD38-APCA750	2,0 cells/µL
Моноциты + CD38-APCA750	1,0 cells/µL
Гранулоциты + CD38-APCA750	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD38-APCA750	10	63,11	41,24	0,65	0,69	1,04	1,68
Моноциты + CD38-APCA750	10	99,85	99,49	0,14	0,34	0,14	0,35
Гранулоциты + CD38-APCA750	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD36
Клон	FA6.152
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Fetal erythrocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4 - 7
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD36-FITC

REF B49201 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD36 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD36 является многофункциональным мембранным рецептором, присутствующим на тромбоцитах, адипоцитах, миоцитах, капиллярных эндотелиальных клетках, большинстве профессиональных фагоцитов, эпителиальных клетках в кишечнике, почках и молочной железе и клетках Сертоли яичек (у пожилых мужчин и у мужчин с гипосперматогенезом) (1). CD36 служит фагоцитарным рецептором (скавенджер-рецептором) для окисленных фосфолипидов, апоптозных клеток и определенных микробных патогенов и также известен как FAT (транслоказа жирных кислот), связывающая длинноцепочечные свободные жирные кислоты и упрощающая их транспортировку в клетки (2,3). На макрофагах взаимодействие CD36 с окисленными LDL (oxLDL) вызывает сигнальный ответ, являющийся провоспалительным и проатерогенным, и на адипоцитах приводит к хранению липидов (3).

На тромбоцитах CD36 преобразует внутриклеточные сигналы, что делает их более реактивными в отношении низких концентраций классических агонистов (3). CD36 также является рецептором для модифицированных липопротеинов и β-амилоида и участвует в патогенезе атеросклероза, метаболического синдрома и болезни Альцгеймера. CD36 является частью врожденной иммунной системы, распознавая молекулы, присутствующие на поверхности определенных микробных патогенов, включая стафилококки, микобактерии и грибы, и опосредуя их выведение фагоцитами. CD36 действует как молекула клеточной адгезии в процессе адгезии и агрегации тромбоцитов, во взаимодействиях тромбоцит-моноцит и тромбоцит-опухолевая клетка.

CD36 независимым образом связывает три основные класса внеклеточных лигандов и лигандов и влияет на разные клеточные функции, как тромбоспондин 1 и 2 типа (TSR), t (4). На капиллярных эндотелиальных клетках взаимодействие CD36 с белками, содержащими TSR, опосредует мощный антиандрогенный проапоптозный ответ (5). Дефицит CD36 можно разделить на 2 подгруппы. Фенотип I типа характеризуется тромбоцитами и моноцитами/макрофагами, демонстрирующими дефицит CD36, тогда как при фенотипе II типа отсутствует экспрессия CD36 на поверхности тромбоцитов, но экспрессия на моноцитах/макрофагах близка к нормальной. (6).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Набор лизирующего реагента для цельной крови (REF 6602764 или 6603152)

  Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Специфические антитела, конъюгированные с FITC, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

ПРОЦЕДУРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАГЕНТА ЛИЗИСА ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

Примечание. Не ссылайтесь на инструкции для лизирующего реагента. Следуйте рекомендованному методу, описанному ниже.

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07795).

1. Добавляют 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Добавляют 1 мл рабочего разведения 1x IMMUNO-LYSE (путем разведения для немедленного применения основного раствора IMMUNO-LYSE на уровне 1/25 в PBS).

   Немедленно перемешивают на вортексе от 2 до 3 секунд.
5. Добавляют 0,25 мл фиксирующего реагента FIXATIVE (готового к использованию реагента), как только препарат становится прозрачным.

   Немедленно перемешивают на вортексе от 2 до 3 секунд.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Добавьте в каждую пробирку по 3 мл PBS.
7. Центрифугируют в течение 3 минут при 275 g при комнатной температуре.
8. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией и промывают осадок клеток, используя 3 мл PBS.

   Центрифугируют в течение 3 минут при 275 g при комнатной температуре.

   Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ. В обязательном порядке защищайте подготавливаемые материалы от солнечного света, храните их при температуре от 2 до 8°C и анализируйте в течение 24 ч.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD36 является фагоцитарным рецептором (скавенджер-рецептором) с многочисленными физиологическими функциями. Он также известен как гликопротеин IV тромбоцитов GPIV или GPIIIb. Кристаллическая структура CD36 показывает существование большой полости, которая проходит по всей длине молекулы. Эта полость служит туннелем, по которому холестерин (сложные эфиры) поставляются от связанного липопротеина ко внешнему листку плазматической мембраны (7,8). FA6.152 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD36 на 5-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Boston, США, в 1993 г. (9).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (10). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD36-FITC	6,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Моноциты + CD36-FITC	10	99,88	99,94	0,11	0,07	0,11	0,07

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-ECD

REF B49202 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD34 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от BM-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

В целом, CD34 рассматривается как поверхностный антиген, подходящий для селекции субпопуляций клеток-предшественников из более крупных клеточных популяций, в том числе клеток мезенхимы, и не связанный только с гематопоэтическими и эндотелиальными клетками (13). Клетки CD34+ из многих типов ткани могут представлять собой источник клеток-предшественников, которые могут использоваться клинически в регенеративных медицинских стратегиях (14, 15).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07797).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Показатели по эффективности были получены с помощью вышеописанной процедуры на линии положительных клеток KG1a. Анализ был выполнен в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (16).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (17). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
KG1a+ CD34-ECD	2,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток KG1a в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
KG1a+ CD34-ECD	10	100,00	99,99	0,00	0,01	0,00	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-PC5.5

REF B49203 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD3 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (26). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD3-PC5,5 +	7,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD3-PC5,5	10	77,18	63,94	0,74	0,73	0,95	1,15

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (27).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (28).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Lignée T + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 1,7 - 3,2
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-Pacific Blue

REF B49204 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD3 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Специфические антитела, конъюгированные с Pacific Blue, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

встряхивают на Vortex в течение одной секунды, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (26). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD3-Pacific Blue +	4,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD3-Pacific Blue	10	78,18	77,52	0,58	0,73	0,74	0,94

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (27).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (28).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD27
Клон	1A4CD27
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	PHA stimulated human T cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD27-PC7

REF B49205 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD27 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD27 помогает дифференциировать Т-клетки памяти типа CD8+ (CD27+) от Т-клеток эффекторного типа CD8+ Т (CD27–). Взаимодействие CD27/CD70 регулирует пролиферацию В-клеток и дифференциацию Т-клетками, усиливает опосредуемые TCR пролиферативные сигналы и увеличивает эффекторную функцию (1). Сигнализация CD27 может либо улучшить функцию Т-клеток или привести к Т-клеточной дисфункции, в зависимости от продолжительности и условий лигирования рецептора CD70, модулирующего взаимодействие CD70–CD27. Это привлекательная стратегия для лечения солидных опухолей и определения непосредственной мишенью лейкозные стволовые клетки (2).

CD27 на В-клетках помогает дифференцировать В-клетки памяти (CD27+) от наивных В-клеток (CD27–) и регулирует активацию В-клеток и синтез иммуноглобулина. CD27 обычно используется как маркер для В-клеток памяти с переключением и без переключения синтеза классов (CD27+IgD– и CD27+IgD+), он используется для классификации дефицитов В-клеток, включая разные распространенные иммунодефициты (3). В связи с ролью CD27 в пролиферации и цитотоксической активности, специфическое моноклональное антитело CD27 было испытано как агонист в моделях опухолей и продемонстрировало сильную стимулирующую и антинеопластическую активность (4). Отсутствие CD27 является отличительной чертой лейкоза ворсистых клеток среди В-клеточных злокачественных новообразований (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены в течение 24 часов после венепункции, с использованием процедуры, описанной выше на пробах, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD27 является членом семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) (6). Структурно оно является трансмембранной молекулой I типа (270 аминокислот). Внеклеточный домен имеет три связанных участка гликирования. На Т-клетках CD27 преимущественно экспрессирует на подмножестве наивных клеток CD45RA+CD45RO– Т-лимфоцитов CD4+, тогда как у большинства Т-клеток памяти (CD45RA– CD45RO+) отсутствует CD27 (7). Гликопротеин CD27 располагается на медуллярных тимоцитах, периферических Т-клетках, подмножестве зрелых В-клеток и NK-клеток (8,9). Активация Т-клеток, при вовлечении молекулы CD27, приводит к повышающему регулированию экспрессии CD27 как встроенного в клеточную поверхность, а также к высвобождению растворимой формы CD27 (sCD27) (6,7,10).

Моноклональное антитело (mAb) 1A4CD27 было отнесено к кластеру дифференцирования CD27 во время 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1993 г. (8,9).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD27-PC7	7,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD27-PC7	10	58,94	71,32	1,02	0,37	1,73	0,52

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип, COULTER, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios, VersaLyse являются торговыми марками компании Beckman Coulter, Inc. и зарегистрированы в Бюро по патентам и товарным знакам США (USPTO).

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD235a
Клон	11E4B-7-6 (KC16)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human red blood cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 3,0 - 4,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD235a-FITC

REF B49206 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD235a антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Гликофорин А представляет собой сиалогликопротеин, который экспрессируется на поверхности эритробластных клеток предшественников (начиная со стадии про-эритробласта) ретикулоцитов и зрелых эритроцитов (1–3). Антитела к гликофорину позволяют произвести идентификацию и подсчет клеток эритроцитарной линии.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

МЕТОДИКА НА ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ, ЛИЗИРОВАННОЙ/ПРОМЫТОЙ ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИЗИРОВАНИЯ VERSALYSE

CD235a-FITC представляет собой маркер незрелых и зрелых эритроцитов. В случае смеси специфической клеточной линии CD235a с цельной кровью необходимо лизировать эритроциты из цельной крови, прежде чем выполнять шаг инкубации с конъюгатом CD235a-FITC. Протокол ниже описывает выполнение:

1. Готовят x пробирок для каждого донора (x пробирок зависит от исследуемых характеристик)
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Добавляют 1 мл VersaLyse + фиксирующая смесь IOTest3 (1 мл Versalyse Ref. A09777+ 25 мкл фиксирующего раствора IOTest3 10X Ref. A07800) Незамедлительно перемешивают на вортексе в течение 1–2 секунд и инкубируют 10 минут при комнатной температуре, с защитой от света.
4. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
5. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией, добавляют по 3 мл PBS 1X в каждую пробирку
6. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
7. Удаляют надосадочную жидкость аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя 0,1 мл PBS 1X
8. Добавляют 20 мкл CD235a-FITC в каждую тестовую пробирку и 20 мкл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку. Немедленно перемешивают на вортексе от 1 до 2 секунд.
9. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
10. Добавляют 3 мл PBS 1X в каждую пробирку
11. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:
12. 0,5 мл PBS 1X формальдегид 0,1% (можно получить разведением 1 мл PBS 1X + 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest3 10X)

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ
Моноклональные антитела 11E4B 7 6 (KC16) взаимодействуют с 27 39 аминокислотной последовательностью N концевого участка гликофорина A и не распознают гликофорин B (3).

На седьмой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (7th HLDA), проходившей в Хэррогите, Англия, в 2000 г., было подтверждено, что данные моноклональные антитела направлены против CD235a (WS Code : 70359, Section : Red Cells) (4).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE
Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (6). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
HEL CD235a+	16 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE
Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
HEL CD235a+	10	99,98	99,95	0,02	0,03	0,02	0,03

ОГРАНИЧЕНИЯ
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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (7).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (8).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ
Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов
Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD23
Клон	9P25
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	EBV transformed lymphoblastoid cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD23-PE

REF B49207 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD23 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

CD23 экспрессирует на активированных зрелых В-клетках, экспрессирующих IgM или IgD, на активированных моноцитах / макрофагах, субпопуляциях Т-клеток, тромбоцитах, эозинофилах, клетках Лангерганса, фолликулярных дендритных клетках (CD23 совместно с CD21, CD35) и эпителии кишечника (1, 2, 3). Напротив, отсутствие экспрессии CD23 на базофилах, покоящихся В-клетках, В-клеточных лимфомах (лимфома Беркитта, лимфома по типу лимфомы Беркитта), фолликулярной лимфоме, лимфоме из клеток мантии и лимфоме маргинальной зоны представляет отдельный фенотип для дифференциальной диагностики. CD23 выступает как фактор роста и активации В-клеток, способствуя дифференцировке в плазматические клетки. Возможна секреция укороченной молекулы. В таком случае она функционирует как мощный митогенный фактор роста (sCD23). Растворимая форма также контролирует синтез IgE и гомеостаз в В-клетках (4, 5). Мембранная форма CD23 регулирует синтез IgE через связывание CD21 и IgE.

CD23 опосредует многочисленные связанные с IgE иммунные ответы (включая фокусирование на аллергене) путем увеличения презентации комплекса антигенов IgE, регулирования синтеза IgE, влияния на клеточную дифференциацию и рост как В-, так и Т-клеток, а также стимулирования выработки провоспалительных медиаторов от моноцитов/макрофагов, эозинофилов и даже клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей. Моноклональное антитело (MAb), направленное на CD23, является многообещающей перспективной терапией при аллергических заболеваниях (моноклональное антитело к CD23 — Лумиликсимаб) (6). Обычно лимфома из клеток мантии (MCL) является отрицательной на CD23 или содержит малое его количество, в то время как мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома/хронический лимфоцитарный лейкоз (SLL/CLL) являются CD23-положительными. Различие между SLL/CLL и MCL имеет важное клиническое значение в отношении прогноза и терапии, и MCL, экспрессирующая CD23+, может быть связана с лучшим прогнозом (7,8,9).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD23 — трансмембранный гликопротеин с молекулярным весом 45 кДа, пространственно связанный с главным комплексом гистосовместимости (MHC) II класса. Молекула CD23, именуемая также FcgammaRII, является низкоафинным рецептором для IgE. Антиген CD23 экспрессируется главным образом на B-лимфоцитах и моноцитах. Он также присутствует на клетках других типов, таких как T-лимфоциты, эозинофилы, тромбоциты, клетки Лангерганса, субпопуляция тимических эпителиальных клеток и нейтрофилы. На B-лимфоцитах экспрессия CD23 повышается при активации и в полностью исчезает при дифференцировке до секретирующих плазмоцитов. Существует растворимая форма CD23 (sCD23), она может (как и CD23) быть вовлечена в регуляцию синтеза IgE и в процессы воспаления (10, 11)

Моноклональным антителам 9P25 кластер дифференцировки CD23 был присвоен на 6-м совещании по дифференцировочным антигенам человека (6th HLDA Workshop) в Кобе, Япония в 1996 (WS Code: CD23.1, Section B) (12).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (13). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD23-PE +	6,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD23-PE	10	10,58	18,81	0,51	0,96	4,80	5,12

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (14).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (15).
7. Для некоторых доноров на моноцитах может наблюдаться слабое неспецифическое окрашивание

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 5,30 - 6,50
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-Pacific Blue

REF B49208 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD20 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ
Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE
Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (17). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD20-Pacific Blue +	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE
Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD20-Pacific Blue	10	11,16	9,73	0,47	0,47	4,20	4,86

ОГРАНИЧЕНИЯ
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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ
Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов
Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-APC-Alexa Fluor 750

REF 10 мкл / test, B49209 50 tests; 0,5 мл

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD20 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ
Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ
Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (17). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD20-APCA750 +	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ
Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD20-APCA750	10	11,27	8,19	0,30	0,65	2,64	7,97

ОГРАНИЧЕНИЯ
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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ
Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов
Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD2
Клон	39C1.5
Гибридома	X63 x rat
Иммуноген	PHA-stimulated human lymphoblasts
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Крыса
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD2-APC

REF B49210 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD2 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD2 присутствует на приблизительно 80% лимфоцитов периферической крови у здорового человека, на 95% тимоцитов и на 100% Т-клеточных лимфоцитов (1). Континуум слабой экспрессии антигена CD2 был описан для моноцитов, наиболее положительные из которых демонстрируют характеристики дифференцировки дендритных клеток (2). CD2 экспрессирует на большинстве Т-клеток и NK-клеток человека и играет важную роль в передаче сигнала и в опосредовании клеточной адгезии в Т-лимфоцитах и NK-клетках (3). Преобладающее преимущество Т-клеточных лимфом и лейкозов также экспрессирует CD2, благодаря чему возможно использовать присутствие антигена для отличения этих состояний от В-клеточных новообразований.

В то время как CD2 не является строго специфичным для линии Т-клеток маркером, он полезен при идентификации Т-клеточной лимфобластной лимфоме (T-LBL). T-LBL представляет примерно 2% всех лимфом и обычно TdT-положительная и по-разному экспрессирует CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 и CD8 (4). Подобным образом, CD2 также является полезным маркером для идентификации клеток острого Т-клеточного лейкоза-лимфомы (ATLL), которые обычно экспрессируют цитоплазменные CD3, CD2/CD5/CD30/CD25 и CD1a, но отрицательны на TdT и мембранные CD3/CD7/CD4/CD8/CD34/CD10 (5). Изредка CD2 ошибочно экспрессирует на опухолевых клетках миелоидной линии. Уникальная экспрессия CD2 на миелоидных клонах может быть полезной для определения минимального остаточного заболевания (6, 7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD2 рассматривается как член суперсемейства иммуноглобулинов; у него есть два иммуноглобилинподобных домена во внеклеточной части (8, 9). Экспрессия CD2 и молекулярное взаимодействие связано с человеческим опосредованным Т-лимфоцитами цитолизом (10). Молекула клеточной адгезии CD2 и ее лиганд CD58 предлагают хорошие примеры взаимодействия белок-белок в клетке, принимающего участия в иммунном ответе. Кроме того, внутриклеточные сигнальные пути и сети CD2 открываются путем идентификации нескольких белков, связывающих цитозольный хвост (11). Недавно было продемонстрировано, что взаимодействие рецептор-лиганд CD2-CD58/48 способствует образованию нанотрубок и требуется для него в человеческих NK-клетка, содействуя цитотоксической функции NK-клеток (12). Моноклональное антитело 39C1.5 ингибирует розеткообразование с бараньими эритроцитами (13).

Он был отнесен к CD2 во время семинара 2nd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: 144, секция T) (14, 15).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (16). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD2-APC +	2,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD2-APC	10	86,47	77,14	0,46	1,18	0,53	1,53

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY 18 lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-PC5.5

REF B49211 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD19 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения B-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для B-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев B-клеточных новообразований и моноклонального B-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях B-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую B-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение B-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона B-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с B-клеточным острым лимфобластным лейкозом (B-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов B-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими B-/T-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка B-клеток, а также степени функционального восстановления B-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A62833).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

   Удалите супернатант путем аспирации и перерастворите клеточную массу, используя 0,5 мл PBS. Пробы необходимо проанализировать в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим C-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов B-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов B-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых B-клеток.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD19-PC5,5 +	6,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD19-PC5,5	10	5,56	7,71	0,28	0,37	5,09	4,80

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY 18 lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-APC-Alexa Fluor 700

REF B49212 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD19 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения В-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в В-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников В-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для В-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев В-клеточных новообразований и моноклонального В-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях В-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую В-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение В-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона В-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов В-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими В-/Т-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка В-клеток, а также степени функционального восстановления В-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79391).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим C-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов B-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов B-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых B-клеток.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD19-APCA700 +	4,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD19-APCA700	10	5,90	9,90	0,18	0,30	3,11	2,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.
8. На субпопуляции лимфоцитов может происходить слабое неспецифичное связывание некоторых доноров с конъюгатами APC-Alexa Fluor 700.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY 18 lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 5,20-6,60
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-Pacific Blue

REF B49213 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD19 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения B-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для B-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев B-клеточных новообразований и моноклонального B-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях B-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую B-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение B-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона B-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с B-клеточным острым лимфобластным лейкозом (B-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов B-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими B-/T-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка B-клеток, а также степени функционального восстановления B-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Специфические антитела, конъюгированные с Pacific Blue, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим C-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов B-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов B-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых B-клеток.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD19-Pacific Blue +	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD19-Pacific Blue	10	14,21	12,38	0,40	0,41	2,84	3,34

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD56
Клон	N901(NKH1)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human chronic myeloid leukemia (hCML) cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD56-ECD

REF B49214 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD56 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Моноклональные антитела N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, который экспрессируется большинством натуральных киллеров (NK-клеток) периферической крови (1,2), а также субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3). NK-клетки характеризуются собственной и специфической цитотоксической активностью, которая проявляется, когда нарушается равновесие ингибирующих сигналов от иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (ИРК) и активирующих сигналов от рецепторов естественной цитотоксичности (РЕЦ). Таким образом, когда ИРК узнают достаточное число молекул HLA I на поверхности клетки-мишени, они подают в NK-клетки сигнал, способный ингибировать лизис. Напротив, если число таких молекул HLA недостаточно (случай опухолевых или инфицированных вирусом клеток), литический сигнал от РЕЦ не ингибируется, что приводит к лизису клетки-мишени (4).

У здоровых людей среди примерно 15% от общего числа лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих антиген NKH-1, более 95% клеток обладают как неспецифической, так и специфической цитотоксической активностью. Этот реагент позволяет характеризовать клеточные популяции или субпопуляции с NK и/или цитотоксической активностью, ассоциированной с фенотипом CD56+. Он также позволяет изучать эти популяции при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (2), аутоиммунные состояния, гиперчувствительность, вирусные инфекции и восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа (5). Наконец, он может быть полезен при фенотипировании злокачественных дискразий крови, таких как лейкемии и лимфомы (6,7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07797).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекулярная масса сильно гликированного белка CD56 (молекулы NKH1) составляет 200–220 kDa (1,3). Он экспрессирует на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, которые демонстрируют не ограниченную главным комплексом гистосовместимости цитотоксичность (1,2). Моноклональное антитело N901 (NKH-1) вступает в реакцию с большинством NK-клеток (1,3). Оно также вступает в реакцию с небольшой популяцией CD3-положительных Т-клеток, которая опосредует пониженную цитотоксическую активность (2). Это антитело не вступает в реакцию с моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами. Антитело N901 (NKH-1) было отнесено к кластеру дифференцирования CD56 на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (10).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD56-ECD +	1,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD56-ECD	10	21,76	15,06	0,59	0,65	2,71	4,29

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD16
Клон	3G8
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human neutrophils
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 7,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD16-FITC

REF B49215 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD16 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

CD16 остается важнейшим индикатором для определения подгрупп популяций «природных клеток-киллеров» при злокачественных заболеваниях крови, трансплантациях, аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитах, а также для идентификации различных функциональных популяций NK в реакциях на воспаление и микробные инфекции (1,2).

При злокачественных заболеваниях кроветворной системы экспрессия CD16 на определенных типах клеток лейкемии имеет значение при определении прогноза (3,4). Популяция, определенная как T NK-подобные клетки CD16+, оказывается полезной при определении активности болезни при некоторых типах CLL (5). Важно то, что недавние клинические исследования выявили, что CD16 является потенциальным кандидатом для разработки новой иммунотерапии для борьбы с лейкемией B-клеток и AML на основе клеток (6,7).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07795).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD16 представляет собой низкоаффинный рецептор IgG (FcγRIII), связывающий иммунные комплексы, но не мономерный IgG. Антиген CD16 существует в двух различных формах, зашифрованных в двух различных генах: FcγRIIIA (или III-2) и FcγRIIIB (или III-1). Генетическая гетерогенность CD16 приводит к появлению альтернативных молекул, связанных с мембраной. Одна из них – трансмембранная форма (FcγRIIIA, 50 – 65 kDa), экспрессированная на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Другая — форма, связанная с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) (FcγRIIIB, 48 kDa), экспрессируемая только на нейтрофилах (8,9).

Было показано, что антиген CD16 не может быть нековалентно связан в мембране NK-клеток с цепью 16 kDa CD3ζ (10) или с двумерной цепью FcRγ (11). Моноклональное антитело 3G8 (mAb) связывается с FcγRIIIA, а также с FcγRIIIB (сильно). Было показано, что оно почти полностью блокирует связывание димеров IgG с FcγRIIIB (12). Эксперименты, в которых к молекуле FcγRIIIB были применены аминокислотные мутации, показали, что на 3G8 mAb оказывают влияние замены Lys162 и Val164 в цикле FG проксимального по отношению к мембране области молекулы, похожей на Ig (13). 3G8 mAb была присвоена CD16 во время Пятого семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1993 году (14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD16-FITC +	2,0 cells/µL
Гранулоциты CD16-FITC +	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD16-FITC	10	29,36	13,92	0,67	0,59	2,28	4,24
Гранулоциты + CD16-FITC	10	91,43	99,48	0,41	0,08	0,45	0,08

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD16
Клон	3G8
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human neutrophils
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD16-ECD

REF B49216 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD16 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD16 остается важнейшим индикатором для определения подгрупп популяций «природных клеток-киллеров» при злокачественных заболеваниях крови, трансплантациях, аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитах, а также для идентификации различных функциональных популяций NK в реакциях на воспаление и микробные инфекции (1,2).

При злокачественных заболеваниях кроветворной системы экспрессия CD16 на определенных типах клеток лейкемии имеет значение при определении прогноза (3,4). Популяция, определенная как T NK-подобные клетки CD16+, оказывается полезной при определении активности болезни при некоторых типах CLL (5). Важно то, что недавние клинические исследования выявили, что CD16 является потенциальным кандидатом для разработки новой иммунотерапии для борьбы с лейкемией B-клеток и AML на основе клеток (6,7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07797).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD16 представляет собой низкоаффинный рецептор IgG (FcγRIII), связывающий иммунные комплексы, но не мономерный IgG. Антиген CD16 существует в двух различных формах, зашифрованных в двух различных генах: FcγRIIIA (или III-2) и FcγRIIIB (или III-1). Генетическая гетерогенность CD16 приводит к появлению альтернативных молекул, связанных с мембраной. Одна из них – трансмембранная форма (FcγRIIIA, 50 – 65 kDa), экспрессированная на NK-клетках, моноцитах и макрофагах. Другая — форма, связанная с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) (FcγRIIIB, 48 kDa), экспрессируемая только на нейтрофилах (8,9).

Было показано, что антиген CD16 не может быть нековалентно связан в мембране NK-клеток с цепью 16 kDa CD3ζ (10) или с двумерной цепью FcRγ (11). Моноклональное антитело 3G8 (mAb) связывается с FcγRIIIA, а также с FcγRIIIB (сильно). Было показано, что оно почти полностью блокирует связывание димеров IgG с FcγRIIIB (12). Эксперименты, в которых к молекуле FcγRIIIB были применены аминокислотные мутации, показали, что на 3G8 mAb оказывают влияние замены Lys162 и Val164 в цикле FG проксимального по отношению к мембране области молекулы, похожей на Ig (13). 3G8 mAb была присвоена CD16 во время Пятого семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1993 году (14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD16-ECD +	1,0 cells/µl
Гранулоциты + CD16-ECD	3,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD16-ECD	10	5,14	9,78	0,22	0,44	4,28	4,47
Гранулоциты + CD16-ECD	10	86,43	99,36	0,48	0,05	0,55	0,05

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD15
Клон	80H5
Гибридома	MOPC 315-43 x balb/c
Иммуноген	Human granulocytes
Иммуноглобулин	IgM
Вид	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: >1
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD15-PC5

REF B49217 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD15 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD15 ценен для выявления и определения различных нарушений со стороны кроветворной системы (1). Выявление CD15 может быть полезным на нескольких стадиях заболевания. Он оказался ключевым индикатором для мониторинга прогресса заболевания при миелодиспластических синдромах, обеспечивая возможность определения зрелости миелобластов (2). CD15 представляет собой диагностический и прогностический инструмент для острых миелоидных лейкозов (3) и экспрессируется почти у всех пациентов с хронической гранулоцитарной лейкемией (4, 5). CD15 также представляет собой рекомендованный индикатор линии для идентификации нейтрофилов при диагностике PNH (6).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с PC5, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD15 (Lewis x/Lex) представляет собой молекулу лакто-N-(нео) фукопентаозы III. Этот эпитоп углевода переносится гликолипидами и гликопротеинами, экспрессируемыми на клеточной мембране. Антиген CD15 сильно экспрессируется нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами и нормальными миелоидными клетками-предшественниками. Он не экспрессируется на нормальных эритроцитах, тромбоцитах или лимфоцитах. Антитело 80H5 распознает ранний миелоидный дифференцирующий эпитоп, который обнаруживается на метамиелоцитах, миелоцитах, промиелоцитах и активированных макрофагах. Оно также вступает в реакцию с гранулоцитами. Моноклональное антитело 80H5 было отнесено к кластеру дифференциации CD15 на Пятом Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Бостоне, США (1993) (7, 8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD15-PC5	3,0 cells/µL
Гранулоциты + CD15-PC5	10,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Моноциты + CD15-PC5	10	99,97	99,89	0,06	0,09	0,06	0,09
Гранулоциты + CD15-PC5	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).

   Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.
7. Известно, что моноклональные антитела изотипа IgM к антигену Lewis x, например, 80H5 (CD15), вызывают агрегацию клеток миеломоноцитарного происхождения (12). Подобные агрегаты могут исключаться из рассматриваемых селекторов и приводить к неточности оценок положительных клеток на CD15.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD15
Клон	80H5
Гибридома	MOPC 315-43 x balb/c
Иммуноген	Human granulocytes
Иммуноглобулин	IgM
Вид	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 12,8 - 15,2
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD15-Pacific Blue

REF B49218 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD15 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD15 ценен для выявления и определения различных нарушений со стороны кроветворной системы (1). Выявление CD15 может быть полезным на нескольких стадиях заболевания. Он оказался ключевым индикатором для мониторинга прогресса заболевания при миелодиспластических синдромах, обеспечивая возможность определения зрелости миелобластов (2). CD15 представляет собой диагностический и прогностический инструмент для острых миелоидных лейкозов (3) и экспрессируется почти у всех пациентов с хронической гранулоцитарной лейкемией (4, 5). CD15 также представляет собой рекомендованный индикатор линии для идентификации нейтрофилов при диагностике PNH (6).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с Pacific Blue, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD15 (Lewis x/Lex) представляет собой молекулу лакто-N-(нео) фукопентаозы III. Этот эпитоп углевода переносится гликолипидами и гликопротеинами, экспрессируемыми на клеточной мембране. Антиген CD15 сильно экспрессируется нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами и нормальными миелоидными клетками-предшественниками. Он не экспрессируется на нормальных эритроцитах, тромбоцитах или лимфоцитах. Антитело 80H5 распознает ранний миелоидный дифференцирующий эпитоп, который обнаруживается на метамиелоцитах, миелоцитах, промиелоцитах и активированных макрофагах. Оно также вступает в реакцию с гранулоцитами. Моноклональное антитело 80H5 было отнесено к кластеру дифференциации CD15 на Пятом Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Бостоне, США (1993) (7, 8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Моноциты + CD15-Pacific Blue	1,0 cells/µL
Гранулоциты + CD15-Pacific Blue	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Моноциты + CD15-Pacific Blue	10	99,84	99,99	0,15	0,03	0,15	0,03
Гранулоциты + CD15-Pacific Blue	10	99,61	99,87	0,29	0,08	0,30	0,08

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).
7. Известно, что моноклональные антитела изотипа IgM к антигену Lewis x, например, 80H5 (CD15), вызывают агрегацию клеток миеломоноцитарного происхождения (12). Подобные агрегаты могут исключаться из рассматриваемых селекторов и приводить к неточности оценок положительных клеток на CD15.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD138
Клон	B-A38
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	U266 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD138-APC

REF B49219 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD138 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD138 ассоциирован с поздней стадией дифференциации B-клеток (плазматических клеток). CD138 не экспрессируется в созревающих/зрелых B-клетках. CD138 рассматривается как идентифицирующий признак для обнаружения плазматических клеток методом проточной цитометрии (1,2). CD138, в сочетании с другими CD, например, CD38, CD45, CD19, CD56, CD20, CD28, CD117, широко используется для идентификации заболеваний, связанных с плазматическими клетками, включая множественную миелому, моноклональную гаммапатию неустановленного значения (MGUS) и более редко плазмоклеточный лейкоз (3,4,5,6).

Описано, что CD138 присутствует в определенным неходжкинских лимфомах и кератоакантомах, его экспрессия обратно коррелирует с агрессивностью опухоли и ее способностью к инвазии (7,8). Недавно была описана целевая терапия путем образования белка слияния IFNα2, нацеленного на клетки, экспрессирующие CD138, с тем ожиданием, что IFN ингибирует пролиферацию и вызовеьт апоптоз первичных клеток у пациентов с множественной миеломой (MM) (9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD138 — синдекан-1 гепарансульфатпротеогликан с очень консервативным трансмембранным и цитоплазматическим доменом I типа и внеклеточным доменом различного размера, содержащим ковалентно связанные цепи гепарин сульфата. Синдекан играет роль в контроле роста, распространении клеток, клеточном распознавании, клеточной адгезии и сигнализации, возможно, в качестве ко-рецепторов с интегринами и молекулами межклеточной адгезии для регулирования клеточной сигнализации и организации цитоскелета (10,11).

Моноклональное антитело B-A38 изучалось во время 8th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (8-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Adelaide, Australia, в 2004 г. (12).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (13). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
U266B1+ CD138-APC+	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
U266B1+ CD138-APC+	10	99,14	99,10	0,08	0,11	0,08	0,11

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (14).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (15).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип, COULTER, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios, VersaLyse являются торговыми марками компании Beckman Coulter, Inc. и зарегистрированы в Бюро по патентам и товарным знакам США (USPTO).

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD127
Клон	R34.34
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Pre-Alp, pre-B leukemic cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	PE
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD127-PE

REF B49220 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD127 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Экспрессия рецептора IL-7 α-цепи (IL-7Rα), CD127, тесно связана с созреванием и функциональной дифференциацией лимфоцитов (1). CD127 экспрессирует в клетках-предшественниках B-лимфоцитов и в большинстве Т-клеток и испытывает понижающую регуляцию при активации Т-клетки (2). CD127 повторно экспрессирует на большинстве эффекторных клеток и Т-клетках памяти, но продолжает испытывать понижающую регуляцию на регуляторных CD4+ CD25+ Т-лимфоцитах (3,4). Наивные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти экспрессируют высокие уровни CD127, в то время как эффекторные клетки представляют собой CD127 (lo), и считается, что удержание рецептора влияет на развитие клеток памяти. Экспрессия CD127 претерпевает резкие изменения в течение ответа Т-клеток при ВИЧ-инфекции.

Утрата активности IL-7, в связи со снижением экспрессии CD127, может вносить свой вклад в наблюдаемую потерю CD8 (+) цитотоксической активности Т-лимфоцита (CTL) при инфекции ВИЧ. Снижение CD127 при прогрессирующем заболевании ВИЧ эффективно восстанавливается в ответ на антиретровирусную терапию. Понижающее регулирование экспрессии CD127 при инфекции ВИЧ может быть связано с хозяином (например, IL-7, IL-4, иммунной активацией) и/или вирусными (например, HIV-tat) факторами, и механизмы регуляции рецептора могут отличаться по типу клеток (5,6,7). Успех основанных на IFN вариантов терапии у пациентов, имеющих сопутствующую инфекцию гепатита С и ВИЧ (HCV/HIV), связан с увеличением стойкого вирусологического ответа (SVR) CD127+ CD4 Т-клеток по сравнению с не давшими ответ (NR) на IFN-α, и увеличение экспрессии CD127 на CD8 Т-клетках наблюдалось после терапии IFN-α у всех пациентов (8). Кроме того, по-видимому, экспрессия CD127 дифференциально модулируется на CD4+ и CD8+ Т-клетках при сахарном диабете 1 типа (9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Специфические антитела, конъюгированные с PE, из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD127 — член семейства рецепторов цитокина, принадлежащего к семейству супергена Ig (10). CD127 экспрессирует как белок 65–75 kDa и 90 kDa на B- и T-клетках соответственно. Структура всей молекулы состоит из 459 аминокислот (внеклеточный фрагмент 219, трансмембранный фрагмент 25 и внутриклеточный фрагмент 195 моноаминокислот). MAb R34.34 был отнесен к кластеру дифференцирования CD127 6-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека (HLDA), который проводился в Kobe, Япония, в 1996 г. (11).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (12). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты + CD127-PE	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Лимфоциты + CD127-PE	10	30,47	41,47	1,74	3,00	5,72	7,23

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD117
Клон	104D2D1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	MOLM-1 leukaemic cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD117-PC7

REF B49221 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD117 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Поскольку его экспрессия происходит именно на ранней стадии гематопоэза, CD117 может быть индикатором острого лейкоза, особенно миелоидной линии (1-2). В небольшом числе случаев острого Т-лейкоза (T-ALL) сообщалось о положительной реакции на CD117, а экспрессия CD117 в случае В-клеток-предшественников-ALL встречается редко (1,3). Исследования показали, что CD117 может быть связан с мастоцитозом (3,4). Одновременный анализ антигенов CD34 и CD117 помогает в определении бластных клеток миелоидного происхождения: степень незрелости определяется экспрессией CD34, а миелоидное происхождение — коэкспрессия CD117 (1,3,5,6,2,4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности были получены с помощью вышеописанной процедуры на линии положительных клеток MO7E. Анализ был выполнен в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD117, также известен как рецептор фактора стволовых клеток (SCFR), комплект тучных клеток и рецептор стального фактора, представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 145 kDa, зашифрованный набор протоонкогена (1). Молекула CD117 относится к семейству рецепторной тирозинкиназы класса III (RTK). В кроветворной системе молекула CD117 экспрессируется приблизительно на 50% клеток-предшественников CD34+, задействованных в эритроцитарной (7), миеломоноцитарной и мегакариоцитарной дифференциации (3,8). Хотя CD117 в первую очередь является индикатором нелимфоидных клеток-предшественников, сообщалось о его выявлении на ранних лимфоидных клетках-предшественниках (8,9). Экспрессия CD117 была выявлена на небольшой подгруппе покоящихся NK-клеток (яркий CD56) и приблизительно на 30% незрелых CD3– CD4– CD8– тимоцитов (3). CD117 также экспрессируется на тучных клетках (3,8) и выявляется на некроветворных клетках, например, в репродуктивной системе, меланоцитах и эмбриональных клетках мозга (8).

MAb 104D2D1 было отнесено к CD117 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: C-30. Секция C) (8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (10). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD117+	2 cells / µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток MO7E в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
CD117+	10	99,95	99,96	0,03	0,03	0,03	0,03

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD103
Клон	2G5
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human intestinal lymphocytes (HML1)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,0 - 7,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD103-FITC

REF B49222 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD103 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD103 экспрессируется в нескольких подмножествах лимфоцитов, включая небольшое подмножество периферических лимфоцитов (T reg-клетки), на активированных и стимулированных TGF-бета лимфоцитах, на кишечных интраэпителиальных лимфоцитах, лимфоцитах собственной пластинки слизистой оболочки кишечника, эпителиальных дендритных клетках и дендритных клетках, полученных из собственной пластинки слизистой оболочки кишечника. По-видимому, дендритные клетки $CD103^+$ в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза кишечника, вызывая толерогенные иммунные ответы и фенотипические изменения импринтинга на антиген-специфических Т-клетках.

Дендритные клетки, экспрессирующие CD103 в кишечнике, индуцируют Foxp3 T-reg-клетки из Foxp3-CD4 Т-клеток с эндогенным TGF-β и ретиноевой кислотой (1, 2). Кроме того, была описана популяция CD8+ CD103+ Т-клеток с функциями эффекторных и Т-регуляторных клеток, участвующими как эфферентные при отторжении аллотрансплантата и как супрессоры цитотоксичности / пролиферации соответственно (3,4). CD103 включен в панель, характерную для иммунофенотипической характеризации лейкоза ворсистых клеток, которая включает в себя аномально яркие CD20+ CD22+, CD11c+, CD25+, положительные CD103+, CD123+, ассоциированные с отрицательными CD5–, CD10– и CD23– (5,6,7,8).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A12689).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A12689).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD103 (αEβ7) принадлежит к семейству молекул интегринов. Это гетеродимер, состоящий из субъединицы αE и субъединицы β7. CD103 в зрелой форме расщепляется на две цепи с дисульфидной связью (C-концевая цепь 150 кДа и N-концевая цепь 25 кДа). Гетеродимизация CD103 с субъединицей интегрина β7 приводит к образованию интегрина αE/β7 (антиген к лимфоцитам слизистой 1). Комплекс αEβ7 является лигандом для E-кадхерина (который экспрессируется преимущественно в эпителиальных клетках) и взаимодействие между αEβ7 и E-кадхерином приводит к адгезии лимфоцитов к эпителиальным клеткам. Связывание CD103 с E-кадхерином опосредует репопуляцию лимфоцитов в эпителий кишечника и, в дополнение к роли при адгезии, может служить вспомогательной молекулой для активации интраэпителиальных лимфоцитов.

Моноклональное антитело (mAb) 2G5 окрашивает все различные подмножества интраэпителиальных лимфоцитов человека (IEL), а также субпопуляции T-клеток собственной пластинки слизистой оболочки кишечника и мезентериальные лимфобласты. Оно также реагирует с некоторыми лимфоцитами других слизистых оболочек (9,10).

Моноклональное антитело 2G5 было отнесено к кластеру дифференцирования CD103 во время 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1993 г. (код WS: A005) (11).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (12). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Molt16+ CD103-FITC+	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Molt16+ CD103-FITC+	10	100,00	100,00	0,01	0,01	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD10
Клон	ALB1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human Leukemia cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD10-APC
-Alexa Fluor 700

REF B49223 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD10 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD10, который также носит название неприлизин, представляет собой металлоэндопептидазу клеточной поверхности с молекулярным весом 100 кД, которая инактивирует множество биологически активных пептидов. Первоначально он был идентифицирован как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA) и считался опухоль-специфическим. Антиген CD10 экспрессируется на поверхности множества нормальных и опухолевых клеток (1, 2). CD10 обнаруживается на клетках острого лимфоидного лейкоза (ALL), клетках, которые происходят от предшественников В-лимфоцитов, и сообщалось, что он экспрессируется на клетках лимфобластной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы, на поверхности нормальных ранних лимфоидных клеток-предшественников, незрелых В-клеток в костном мозге взрослых и В-клетках зародышевого центра в лимфоидной ткани (3, 4).

CD10 с экспрессией ICOS позволяет дифференцировать ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL) от других Т-клеточных лимфом (CD10–) (5; 6). Кроме того, CD10 может помочь дифференцировать лимфому Беркитта (BL) и CD10+ диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (7, 8). В дополнение к ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме, лимфоме Беркитта и диффузной В-крупноклеточной лимфоме, другие лимфомы могут быть CD10+, такие как лимфома из клеток мантии (9), маргинальной зоны (10) и редкие CD5+ CD10+ лимфомы (11).

Оценка экспрессии CD10 с использованием многопараметрической проточной цитометрии с анализом кластеров является высокочувствительной и специфической для диагностики фолликулярной лимфомы, в частности, когда недостаточно ткани для заключительного диагноза (12). CD10 обычно отрицательный при AML, CLL, EBV+ лимфопролиферативных заболеваниях, лимфоплазмоцитарном, из клеток мантии и маргинальной зоны. Яркая экспрессия CD10, связанная с ярким Bcl-2, может представлять колонизацию фолликулярной лимфомы, поэтому рекомендуется определение стадии опухоли (13).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79391).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Ген CALLA кодирует трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярным весом 100 кД. Родственные CALLA последовательности ДНК обнаружены на хромосоме человека 3J (14). CALLA, (CD10), был описан как поверхностный фермент, экспрессируемый на ранних лимфоидных клетках-предшественниках и нейтрофилах, и был идентифицирован как металлопротеаза цинка, нейтральная эндопептидаза 24.11 (NEP, «энкефалиназа»). Известно, что фермент CD10 гидролизирует множество биологически активных пептидов, в том числе мет-энкефалин, формил-Met-Leu-Phe (f-MLP) и вещество P, которые участвуют в процессе дифференцировки и созревания клеток.

Моноклональные антитела ALB1 были изучены во время первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г. (15).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (16). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Гранулоциты + CD10-APC-A700	4,0 cells/µl

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Гранулоциты + CD10-APC-A700	10	98,52	99,70	0,24	0,04	0,24	0,04

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD14
Клон	RMO52
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Isolated human monocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD14-ECD

REF B92391 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD14 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и умеренно – на нейтрофилах, подгруппе популяции дендритных клеток и макрофагах. CD14 – полезный индикатор для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML). Одновременный анализ экспрессии антигенов CD14 и CD13 помогает дифференцировать M4 AML (1) с моноцитарной онтогенностью (CD14+CD13+ фенотип) от M2 AML с немоноцитарной онтогенностью (CD14–CD13+ фенотип) (2; 3; 4; 5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD14 представляет собой белок молекулярным весом в 53 – 55 kDa, связанных в мембране с помощью группы гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (6). Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и макрофагах и умеренно — на многоядерных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нейтрофилах периферической крови; он также присутствует на плевральных фагоцитах и дендритных ретикулярных клетках. CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарной линейки и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Он отсутствует в Т-лимфоцитах, а также в NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (7).

Моноклональное антитело RMO52 было отнесено к CD14 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: MA62, секция M) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (8). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Monocytes CD14-ECD+	2,0 cells/µL
Granulocytes CD14-ECD+	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Monocytes CD14-ECD+	10	98,65	97,91	0,59	0,54	0,60	0,55
Granulocytes CD14-ECD+	10	100	99,99	0,00	0,02	0,00	0,02

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD38
Клон	LS198-4-3
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human T cell line HUT 78
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 6 -8
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD38-Pacific Blue

REF B92396 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD38 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Определение характеристик и подсчет популяций лейкоцитов, экспрессирующих молекулу CD38 при заболеваниях иммунной системы, первоначально привели к повышенной экспрессии молекулы CD38 по отношению к активации клеток при иммунодефиците, вирусных инфекциях и B-клеточных новообразованиях (B-CLL и плазмоклеточная дискразия) (1,2,3,4). У больных с вирусом иммунодефицита человека (HIV)/синдромом приобретенного иммунодефицита (AIDS) экспрессия CD38 на T-клетки связана с активацией клеток и потенциально полезна для анализа иммунологического статуса (5,6). Клиническая деятельность подтверждает, что клоны миеломных клеток действительно экспрессируют CD38 у большинства пациентов, хотя с различными значениями поверхностной плотности (7). Существует связь между экспрессией CD38 клетками CLL и более активным развитием болезни (8,9,10). CD38 экспрессируется у большинства более агрессивных с клинической точки зрения лейкозных клонов, требующих лечения (9,10). В настоящее время CD38 выбран в качестве основного средства для mAb-зависимой терапии (11)

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль Pacific Blue : Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD38, также называемый антигеном T10, представляет собой трансмембранный гликопротеин с одной цепью типа II, у которого цитоплазматическая конечная N-секция (1,12). Этот гликопротеин с молекулярным весом, близким к 45 kDa, экспрессируется в большом числе гемопоэтических клеток: его распределение зависит от этапа дифференциации и степени клеточной активации. Функциональная молекула представляет димер или мультимер (13,14,15). Одной из функций, которую первоначально приписывали CD38, является регуляция активации и пролиферации человеческих Т-лимфоцитов (5,6 и 16).

Лигирование CD38 агонистическими моноклональными антителами (mAb) вызывает быстрое выделение Ca2+ и запускает процесс фосфорилирования каскада интрацеллюлярный субстратов, что приводит к активации комплекса NF-κB (17,18). В слое В-клеток CD38 экспрессируется на высоких уровнях только костным мозгом с коммитированными клетками-предшественниками (ранние ВМ-клетки — CD38–) и В-лимфоцитами в герминативных центрах, плазмацитами на последней стадии дифференцировки и в активированных миндалинах (8,9,10). Напротив, зрелые девственные В-лимфоциты и В-лимфоциты памяти экспрессируют низкие уровни этой молекулы. Точнее говоря, на уровне лимфоцитарной дифференциации В-клеток экспрессия молекулы CD38 появляется на ранних этапах и исчезает во время созревания В-клеток, а затем снова появляется на финальном этапе дифференциации (плазмоцитарный этап).

Молекула CD38 экспрессируется активированными лимфоцитами Т- и В-клеток (19,20), моноцитами, большинством естественных клеток-убийц, медуллярными тимоцитами (21,22), а также в тромбоцитах (23) и эритроцитах (24). В циркулирующих лимфоцитах Т-клеток, обнаружена очень слабая экспрессия CD38. Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: T-CD38.06, раздел T) для CD38 было назначено моноклональное антитело LS198 (24).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (25). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Лимфоциты CD38-Pacific Blue +	2,0 cells/µL
Моноциты + CD38-Pacific Blue	1,0 cell/µL
Гранулоциты + CD38-Pacific Blue	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты + CD38-Pacific Blue	10	44,57	58,81	0,85	0,92	1,90	1,56
Моноциты + CD38-Pacific Blue	10	99,95	99,94	0,07	0,10	0,07	0,10
Гранулоциты + CD38-Pacific Blue	10	100,00	100,00	0,01	0,00	0,01	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD10
Клон	ALB1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human Leukemia cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD10-APC

REF B92400 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD10 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD10, который также носит название неприлизин, представляет собой металлоэндопептидазу клеточной поверхности с молекулярным весом 100 кД, которая инактивирует множество биологически активных пептидов. Первоначально он был идентифицирован как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA) и считался опухоль-специфическим. Антиген CD10 экспрессируется на поверхности множества нормальных и опухолевых клеток (1, 2). CD10 обнаруживается на клетках острого лимфоидного лейкоза (ALL), клетках, которые происходят от предшественников В-лимфоцитов, и сообщалось, что он экспрессируется на клетках лимфобластной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы, на поверхности нормальных ранних лимфоидных клеток-предшественников, незрелых В-клеток в костном мозге взрослых и В-клетках зародышевого центра в лимфоидной ткани (3, 4).

CD10 с экспрессией ICOS позволяет дифференцировать ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL) от других Т-клеточных лимфом (CD10–) (5; 6). Кроме того, CD10 может помочь дифференцировать лимфому Беркитта (BL) и CD10+ диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (7, 8). В дополнение к ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме, лимфоме Беркитта и диффузной В-крупноклеточной лимфоме, другие лимфомы могут быть CD10+, такие как лимфома из клеток мантии (9), маргинальной зоны (10) и редкие CD5+ CD10+ лимфомы (11).

Оценка экспрессии CD10 с использованием многопараметрической проточной цитометрии с анализом кластеров является высокочувствительной и специфической для диагностики фолликулярной лимфомы, в частности, когда недостаточно ткани для заключительного диагноза (12). CD10 обычно отрицательный при AML, CLL, EBV+ лимфопролиферативных заболеваниях, лимфоплазмоцитарном, из клеток мантии и маргинальной зоны. Яркая экспрессия CD10, связанная с ярким Bcl-2, может представлять колонизацию фолликулярной лимфомы, поэтому рекомендуется определение стадии опухоли (13).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ IM2475).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Ген CALLA кодирует трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярным весом 100 кД. Родственные CALLA последовательности ДНК обнаружены на хромосоме человека 3J (14). CALLA, (CD10), был описан как поверхностный фермент, экспрессируемый на ранних лимфоидных клетках-предшественниках и нейтрофилах, и был идентифицирован как металлопротеаза цинка, нейтральная эндопептидаза 24.11 (NEP, «энкефалиназа»). Известно, что фермент CD10 гидролизирует множество биологически активных пептидов, в том числе мет-энкефалин, формил-Met-Leu-Phe (f-MLP) и вещество P, которые участвуют в процессе дифференцировки и созревания клеток.

Моноклональные антитела ALB1 были изучены во время первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г. (15).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (16). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Granulocytes CD10-APC+	3,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Granulocytes CD10-APC+	10	96,59	94,00	0,11	0,31	0,12	0,33

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD203c
Клон	97A6
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	UT-7 megakaryoblast cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD203c-PE

REF B92404 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD203c антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Специфические аллергены могут перекрестно сшивать мембраносвязанные антитела IgE, приводя к стимуляции базофилов с увеличением активности разных маркеров активации, включая CD203c, CD63 и CD164 (1,2,3). Основанные на проточной цитометрии тесты на статус активации базофилов могут помочь дифференцировать покоящиеся и активированные аллергенов базофилы по экспрессии CD203c, которое не только конституционно экспрессируется на покоящихся базофилах, но также наблюдается в существенно большей концентрации на активированных базофилах. (4,5,6).

Тест активации базофилов (BAT) являлся инструментом диагностики немедленной лекарственной аллергии и лекарственной гиперчувствительности (7,8). BAT может помочь в случаях пищевой аллергии, когда кожная инъекционная проба и специфические IgE являются неоднозначными, и может помочь уменьшить необходимость в пищевой провокационной пробе (OFC). OFC — процедура, требующая существенных трудозатрат и ресурсов, с риском возникновения острой аллергической реакции, которая потенциально может оказаться тяжелой (6).

Избирательная экспрессия CD203c+/ CD117–, как было продемонстрировано, является полезным фенотипическим профилем для идентификации острого базофильного лейкоза в случае высоко недифференцированных бластных клеток. Острый базофильный лейкоз является редким острым миелоидным лейкозом с бластными клетками, которые морфологически недифференцированы. В то время как бластные клетки экспрессируют пан-клеточные лейкоциты CD45, маркеры незрелых клеток (CD34, HLA-DR) и другие миелоидные маркеры (CD134, CD33 and CD11b), диагностика затруднена без цитогенетического и электронно-микроскопического исследований (9). Поверхностные молекулы, такие как CD63 или CD203c, сверхэкспрессируются на неопластических мастоцитах (MC), при системном мастоцитозе (SM), и их активность дополнительно увеличивается при перекрестной сшивке рецептора IgE. Некоторые из поверхностных антигенов, избирательно экспрессируемых на MC или их предшественниках, могут служить терапевтическими мишенями в будущем (10).

Процедуры гемодиализа индуцируют клетки, включая базофилы, вместе с активацией комплемента. Также было выдвинуто предположение, что пациенты на гемодиализе демонстрируют опосредованные IgE анафилактические реакции. Во время процедуры гемодиализа низкопоточная мембрана индуцировала повышение уровня CD203c и CD63 при активации экспрессии на базофилах, позволяя предположить, что изменения активности базофилов могут быть полезным маркером биологической несовместимости мембраны при гемодиализе. (11). Наконец, модулирование активности по увеличению уровней CD203c использовалось для отслеживания и прогнозирования ответа на иммунотерапию, такую как терапия омализумабом (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse
Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

встряхивают на Vortex в течение одной секунды, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD203c представляет собой трансмембранный белок II типа, который относится к семейству ферментов эктонуклеотидпирофосфатаз/фосфодиэстераз 3 (E-NPP3) (8), участвует в гидролизе олигонуклеотидов, нуклеозидфосфатов и НАД. Молекула CD203c экспрессируется на базофилах периферической крови человека, но не на других клетках крови (13). Моноклональное антитело 97A6 было отнесено к кластеру дифференцировки CD203c во время семинара 7th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (7-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Harrogate, England, в 2000 г. (14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
KU812 CD203c-PE$^+$	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
KU812 CD203c-PE$^+$	10	99,81	99,85	0,05	0,05	0,05	0,05

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD33
Клон	D3HL60.251
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	HL60 human cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD33-PC7

REF B92408 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD33 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ антигена CD33 помогает в идентификации бластных клеток миелоидного происхождения (нормальных и злокачественных) и аберрантно экспрессируется популяциями B и T лимфобластной лейкемии/лимфомы (1, 2, 3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD33 является трансмембранным мономерным гликопротеином с молекулярным весом 67 кДа. Эта молекула относится к семейству сиалоадгезина: ее адгезивные свойства зависят от присутствия сиаловой кислоты (7). Молекула CD33 экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками из миеломоноцитарных и эритроидных линий клеток, но отсутствует в клетках лимфоидного происхождения (8). Она значительно экспрессируется на моноцитах и незначительно на циркулирующих гранулоцитах. Моноклональное антитело D3HL60.251 было отнесено к CD33 во время 4-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Вене, Австрия, в 1989 году (код WS: 504, секция M) (7).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (6). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Monocytes CD33-PC7+	1,0 cell/µL
Granulocytes CD33-PC7+	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Monocytes CD33-PC7+	10	94,08	87,79	1,81	4,03	1,92	4,59
Granulocytes CD33-PC7+	10	99,97	99,74	0,02	0,06	0,02	0,06

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (7).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (8).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD5
Клон	BL1a
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Lymphocytes from human thoracic duct
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD5-APC
-Alexa Fluor 750

REF B92413 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD5 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD5 является многофункциональным рецептором, экспрессируемым в сочетании с антиген-специфическими рецепторами на лимфоциты T и B-1a. CD5 играет роль регулятора некроза клеток и рецептора подавления патоген-ассоциированных молекулярных паттернов.

CD5 является T-клеточный маркером, экспрессируемым в развившихся злокачественных B-клеточных новообразованиях и других B-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваниях. Экспрессия CD5 удобна для определения скрытых моноклональных T-клеточных лимфоцитозов и диагностирования T-клеточных новообразований без лейкоцитоза и без признаков неоплазии по клеточной морфологии. В континууме у нормальных политипичных B-клеток экспрессия CD5 постоянна преимущественно на более поздних этапах созревания и в развившихся B-клетках. Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 обеспечивает более точное различие между такими различными B-клеточными пролиферациями, как B-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, мелкоклеточные лимфомы (CD5+ CD23+CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5+CD23– CD19+) (1,2,3,4,5,6).

CD5 используется в дифференциальной диагностике целого ряда лимфом с экспрессией периферической крови (проявление лейкозов), например, a) CD5-положительной фолликулярной лимфомы, b) анализа на остаточную минимальную болезнь неходжкиновских лимфом B-клеточного пути (CD5+), c) CD5-положительной фолликулярной лимфомы; d) CD5-положительной (CD5+) диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL) e) лимфомы из клеток маргинальной зоны (SP-MZL). CD5 рассматривается как независимый ненадежный прогностический признак крайне агрессивной диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (7,8).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD10 позволяет определить характеристики различных случаев B-клеточной неоплазии (6), например, B-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозов, мелкоклеточные лимфом (CD5+CD10– CD19+) и лимфомы из клеток мантии (CD5– CD10+ CD19+) (1,2). Этот анализ также позволяет отличить острые лимфобластные B-клеточные лейкемии (B-ALL) и острые лимфобластные пре-B-клеточные лейкемии (CD5– CD10+CD19+) от пролимфоцитарных лейкозов (CD5– CD10– CD19+) (3,9,10,11,12).

Хронический лимфолейкоз (CLL) характеризуется клональной экспансией B-клеток (CD5(+)CD23(+)) в крови, костном мозге и вторичных лимфоидных тканях. Анализ уровня экспрессии генов и фенотипические исследования показывают, что хронический лимфолейкоз (CLL), возможно, развивается из B-клеток CD5(+), аналогичных тем, которые обнаружен в крови здоровых взрослых индивидов (12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавляют 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов большинством тимоцитов и подгруппой популяции В-лимфоцитов (13,14,15). CD5 экспрессируется в подгруппе В-клеток, выделяющих IgM, из-за недостаточного объема терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) фермента, который появляется для подавления активации BSR, и, тем самым, снижает аутоиммунную реакцию. С другой стороны, Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD5, чем В-клетки. CD5 положительно регулируется в Т-клетках при сильной активации. В вилочковой железе имеется корреляция с экспрессией CD5 и интенсивностью взаимодействия Т-клеток по отношению к аутопептидам. Экспрессия CD5 не обнаружена в гранулоцитах, моноцитах и тромбоцитах (15). Во время семинара 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Оксфорде, Великобритания, в 1986 году (Код WS: 520, раздел T) для CD5 было назначено моноклональное антитело BL1a (13,14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (16). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD5-APC-A750+	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Lymphocytes CD5-APC-A750+	10	80,64	76,38	0,62	0,66	0,76	0,87

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-APC
-Alexa Fluor 700

REF B92417 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD34 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от BM-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

В целом, CD34 рассматривается как поверхностный антиген, подходящий для селекции субпопуляций клеток-предшественников из более крупных клеточных популяций, в том числе клеток мезенхимы, и не связанный только с гематопоэтическими и эндотелиальными клетками (13). Клетки CD34+ из многих типов ткани могут представлять собой источник клеток-предшественников, которые могут использоваться клинически в регенеративных медицинских стратегиях (14, 15).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79391).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (16).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (17). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
KG1a CD34-APC-A700+	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
KG1a CD34-APC-A700+	10	99,98	99,98	0,01	0,01	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD14
Клон	RMO52
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Isolated human monocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD14-APC
-Alexa Fluor 750

REF B92421 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD14 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и умеренно – на нейтрофилах, подгруппе популяции дендритных клеток и макрофагах. CD14 – полезный индикатор для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML). Одновременный анализ экспрессии антигенов CD14 и CD13 помогает дифференцировать M4 AML (1) с моноцитарной онтогенностью (CD14+CD13+ фенотип) от M2 AML с немоноцитарной онтогенностью (CD14–CD13+ фенотип) (2; 3; 4; 5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD14 представляет собой белок молекулярным весом в 53 – 55 kDa, связанных в мембране с помощью группы гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (6). Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и макрофагах и умеренно — на многоядерных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нейтрофилах периферической крови; он также присутствует на плевральных фагоцитах и дендритных ретикулярных клетках. CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарной линейки и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Он отсутствует в Т-лимфоцитах, а также в NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (7).

Моноклональное антитело RMO52 было отнесено к CD14 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: MA62, секция M) (5).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (8). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Monocytes CD14-APC-A750+	1,0 cell/µL
Granulocytes CD14-APC-A750+	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Monocytes CD14-APC-A750+	10	91,10	94,90	1,10	0,66	1,20	0,70
Granulocytes CD14-APC-A750+	10	99,87	99,75	0,03	0,04	0,03	0,04

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD24
Клон	ALB9
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Bone marrow malignant cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD24-PE

REF B92425 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD24 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD24 способствует дифференцировке и активации B-лимфоцитов, и его характер экспрессии меняется в критические моменты во время развития B-клеток (1). CD24 служит ключевым антигеном для определения трех основных поднаборов B-клеток в крови: a) незрелых переходных B-клеток CD19(+) CD24(высокий) CD38(высокий), b) наивных B-клеток CD19(+) CD24(промежуточный) CD38(промежуточный), которые не столкнулись с антигеном, и c) B-клеток памяти CD19(+) CD27(+). На настоящее время B-клетки человека с регуляторными функциями были в основном описаны в пределах поднабора переходных B-клеток CD24 (высокий) CD38 (высокий). Переходные B-клетки CD24 (высокий) CD38 (высокий) способны производить интерлейкин 10 (IL-10) и регулировать in vitro активацию T-клеток Th1 и Th17 CD4(+) (2).

У пациентов, страдающих лимфомами, было обнаружено истощение B-клеток после лечения Ритуксимабом (3). Производящие интерлейкин 10 (IL-10) B-клетки и CD19(+) CD38(высокий) CD24(высокий) B-клетки были обнаружены при ряде клинических состояний, в том числе у получавших многократные переливания иммунизированных аллоантигеном и не иммунизированных аллоантигеном детей с большой формой β-талассемии, при хронической болезни «трансплантат против хозяина» (cGVHD) после аллогенной трансплантации стволовых клеток, и как дефектные CD24(+) CD38(+) B-клетки при анкилозирующем спондилите (4,5,6,7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD24 является гликозил-фосфатидилинозитол-связанным мембранным сиалогликопротеином с молекулярной массой 35–45 кДа. CD24 присутствует на B-клетках, со стадии пре-B до стадии зрелых B-клеток, но не на плазматических клетках. Он экспрессируется на зрелых гранулоцитах и на разных типах эпителиальных клеток. Моноклональное антитело ALB9 было отнесено к кластеру дифференцировки CD24 во время семинара 6th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (6-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Kobe, Japan, в 1996 г. (8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (9). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD24-PE+	5,0 cells/µL
Granulocytes CD24-PE+	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Lymphocytes CD24-PE+	10	4,49	15,23	0,47	0,68	10,53	4,44
Granulocytes CD24-PE+	10	99,75	99,63	0,13	0,29	0,13	0,29

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	NG2
Клон	7,1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Readus cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-NG2-PE

REF B92429 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих NG2 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Экспрессирующие NG2 клетки центральной нервной системы являются отдельным классом клеток глии, играющим значительную роль при восстановлении после травматического повреждения головного мозга, и могут быть вовлечены в патофизиологию множественного склероза, глиомы, эпилепсии, болезни Альцгеймера (1,2,3). NG2 экспрессируется рядом типов клеток в пределах и за пределами нервной системы млекопитающих. NG2 не экспрессируется на нормальных гематопоэтических клетках, но может экспрессироваться на миелоидных и лимфоидных поднаборах с хромосомными и цитогенетическими модификациями. Этот антиген регулирует сигнальные явления, которые важны как для пролиферации клеток, так и для миграции клеток посредством как минимум двух механизмов: киназа фокальной адгезии (FAK) и внеклеточно регулируемые киназы (ERK). Характер экспрессии NG2 при лейкемии остается противоречивым. Первоначально заявлялось, что экспрессия NG2 особым образом ассоциирована с перестройками гена 11q23/MLL (лейкоза со смешанным фенотипом) (4).

В связи с изменчивостью экспрессии NG2 на бластных клетках при лейкозе и потенциальным прогностическим значением, NG2 ввели в диагностические панели иммунофенотипирования (5). NG2 экспрессирует на ранних гематопоэтических стволовых клетках/клетках-предшественниках (CD45+, CD34+, CD38+), пуповинной крови с перестройками MML и без них. NG2 был описан при следующих гематопоэтических злокачественных новообразованиях: острый миелоидный лейкоз (AML), AML монобластический, детский лимфобластный лейкоз и предшественники плазмацитоидные дендритные клетки. Таким образом, гетерогенная экспрессия NG2 на бластных клетках при лейкозе может управляться несколькими молекулярными механизмами и присутствовать у тех пациентов, у которых возникновение лейкоза было вызвано поднаборами экспрессирующих NG2 клеток (6,7,8).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Нейроглиальный антиген-2 (NG2), протеогликан, также известный как хондроитина сульфат протеогликан 4, или ассоциированный с меланомой хондроитина сульфат протеогликан, представляет собой мембранный гликопротеин 250 кДа 1 типа, экспрессируемый многими клетками центральной нервной системы (ЦНС) во время развития и дифференцировки, и играет важную роль в ангиогенезе, заживлении ран и росте опухоли. Класс молекул хондроитина сульфат протеогликана может являться ингибитором адгезии и миграции клеток (9) и может служить барьером для миграции клеток в путь нервного гребня. Моноклональное антитело 7.1 распознает молекулу хондроитина сульфат протеогликана клеточной поверхности с молекулярной массой 200–220 кДа, известную как человеческий гомолог крысиного антигена NG2. Антиген NG2 обнаруживается на популяциях глиальных клеток человека (10). Он не экспрессируется на нормальных гематопоэтических клетках.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
HELA New NG2-PE+	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
HELA New NG2-PE+	10	100,00	99,65	0,01	0,07	0,01	0,07

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-ECD

REF B92433 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD20 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (17). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD20-ECD+	1,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Lymphocytes CD20-ECD+	10	14,03	13,02	1,33	0,57	9,50	4,40

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	HLA-DR
Клон	Immu-357
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	EBV-transformed cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
концентрация	ECD / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	613 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-HLA-DR-ECD

REF B92438 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих HLA-DR антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула HLA-DR представляет собой полезный индикатор для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании в рамках расширенной панели иммунофенотипирования. Анализ экспрессии антигена HLA-DR позволяет определить бластные клетки миелоидного происхождения. Их часто наблюдаемый фенотип: HLA-DR+ CD7– CD45 слабый. Однако гипергранулярные лейкозы промиелоцитарного типа (подгруппа LAM-M3) характеризуются слабой экспрессией индикатора HLA-DR или ее полным отсутствием (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль ECD : Реактив IOTest (Ref. A07797).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07797).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело Immu357 распознает эпитоп, который переносится на мономорфном белке в 29 – 33 kDa, идентифицируемый как HLA-DR. Система HLA (антиген лейкоцитов человека) – название главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Зашифрованные 5 локусами (DM, DO, DP, DQ и DR) локуса D молекулы HLA класса II также называют антигенами HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (2,3). Экспрессия антигенов класса II ограничена антиген-презентирующими клетками, то есть B-лимфоцитами, моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса кожи (3,4). На тимоцитах антиген HLA-DR экспрессируется только после активации (5). Стволовые клетки и кроветворные клетки-предшественники экспрессируют его до определенной стадии своей дифференциации (3,6).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (7). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes HLA-DR-ECD+	1,0 cells/µL
Monocytes HLA-DR-ECD+	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Lymphocytes HLA-DR-ECD+	10	54,51	62,36	1,24	2,04	2,28	3,26
Monocytes HLA-DR-ECD+	10	98,63	99,26	0,71	0,61	0,72	0,62

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома ECD также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии ECD . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии ECD конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Texas Red-X является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD105
Клон	TEA3/17.1.1
Гибридома	X63x balb/c
Иммуноген	TNFα activated HUVEC
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 -1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD105-PE

REF B92442 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD105 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Экспрессия эндоглина (CD105) повышена в эндотелиальных клетках ран в процессе заживления, развивающихся эмбрионах, воспаленных тканях и солидных опухолях. Эндоглин является маркером активированного эндотелия, и его экспрессия в сосудах ограничена пролиферирующими клетками. Уровень экспрессии эндоглина в солидных опухолях нескольких типов коррелирует с различными клинико-патологическими факторами, включая сниженную выживаемость и наличие метастазов (1,2,3,4). Предполагается, что CD105 и плацентарный фактор роста (PlGF) являются прогностическими факторами при остром лимфобластном лейкозе (ALL) (5,6).

Доказано, что экспрессия CD105, вместе с CD71, цитозольным H-ферритином (HF), цитозольным L-ферритином (LF) и митохондриальным ферритином (MtF) в эритробластах от 104 пациентов с MDS является полезной при точной количественной оценке эритроидной дисплазии в ткани костного мозга пациента с подозрением на миелодиспластические синдромы (MDS) (7). Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) имеют особое значение для терапии в связи с простотой их изоляции. Минимальная фенотипическая схема идентификации клеток MSC требует, чтобы они были иммуноположительными на CD105, CD73, CD90, оставаясь отрицательными на CD34, CD45, HLA-DR и другие поверхностные маркеры (8).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD105 представляет собой содержащую RGD молекулу 170–180 кДа, присутствующую на поверхности клеток как дисульфид-связанный гомодимер. Эта молекула является корецептором для трансформирующего фактора роста (TGF) β1 и β3 (9). Она экспрессируется преимущественно на эндотелиальных клетках, но также сильно экспрессируется в пре-B-лимфоцитах и в субпопуляции моноцитов. CD105 является регуляторным белком комплекса рецептора TGF-бета. Он представляет собой модулятор клеточного ответа TGF-бета 1. Моноклональное антитело TEA3/17.1.1 реагирует с эндотелиальными клетками из разных тканей, моноцитами, пре-B-лимфоцитами и проэритробластами из костного мозга. Моноклональное антитело TEA3/17.1.1 было отнесено к кластеру дифференциации CD105 во время шестого семинара International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Международный семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Kobe, Japan, в 1996 г. (код WS: E105) (1).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (10). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD105+ KG1a Cell Line	4,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
CD105+ KG1a Cell Line	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD56
Клон	N901
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human chronic myeloid leukemia (hCML)cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD56-APC
-Alexa Fluor 700

REF B92446 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD56 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Моноклональные антитела N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, который экспрессируется большинством натуральных киллеров (NK-клеток) периферической крови (1,2), а также субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3). NK-клетки характеризуются собственной и специфической цитотоксической активностью, которая проявляется, когда нарушается равновесие ингибирующих сигналов от иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (ИРК) и активирующих сигналов от рецепторов естественной цитотоксичности (РЕЦ). Таким образом, когда ИРК узнают достаточное число молекул HLA I на поверхности клетки-мишени, они подают в NK-клетки сигнал, способный ингибировать лизис. Напротив, если число таких молекул HLA недостаточно (случай опухолевых или инфицированных вирусом клеток), литический сигнал от РЕЦ не ингибируется, что приводит к лизису клетки-мишени (4).

У здоровых людей среди примерно 15% от общего числа лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих антиген NKH-1, более 95% клеток обладают как неспецифической, так и специфической цитотоксической активностью. Этот реагент позволяет характеризовать клеточные популяции или субпопуляции с NK и/или цитотоксической активностью, ассоциированной с фенотипом CD56+. Он также позволяет изучать эти популяции при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (2), аутоиммунные состояния, гиперчувствительность, вирусные инфекции и восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа (5). Наконец, он может быть полезен при фенотипировании злокачественных дискразий крови, таких как лейкемии и лимфомы (6,7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor700 : Реактив IOTest (Ref. A79391).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79391).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекулярная масса сильно гликированного белка CD56 (молекулы NKH1) составляет 200–220 kDa (1,3). Он экспрессирует на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, которые демонстрируют не ограниченную главным комплексом гистосовместимости цитотоксичность (1,2). Моноклональное антитело N901 (NKH-1) вступает в реакцию с большинством NK-клеток (1,3). Оно также вступает в реакцию с небольшой популяцией CD3-положительных Т-клеток, которая опосредует пониженную цитотоксическую активность (2). Это антитело не вступает в реакцию с моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами. Антитело N901 (NKH-1) было отнесено к кластеру дифференцирования CD56 на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (10).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD56-APC-A700+	3,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD56-APC-A700+	10	20,55	21,85	0,36	1,38	1,73	6,34

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD117
Клон	104D2D1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	MOLM-1 leukaemic cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD117-APC
-Alexa Fluor 750

REF B92450 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD117 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Поскольку его экспрессия происходит именно на ранней стадии гематопоэза, CD117 может быть индикатором острого лейкоза, особенно миелоидной линии (1-2). В небольшом числе случаев острого Т-лейкоза (T-ALL) сообщалось о положительной реакции на CD117, а экспрессия CD117 в случае В-клеток-предшественников-ALL встречается редко (1,3). Исследования показали, что CD117 может быть связан с мастоцитозом (3,4). Одновременный анализ антигенов CD34 и CD117 помогает в определении бластных клеток миелоидного происхождения: степень незрелости определяется экспрессией CD34, а миелоидное происхождение — коэкспрессия CD117 (1,3,5,6,2,4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD117, также известен как рецептор фактора стволовых клеток (SCFR), комплект тучных клеток и рецептор стального фактора, представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 145 kDa, зашифрованный набор протоонкогена (1). Молекула CD117 относится к семейству рецепторной тирозинкиназы класса III (RTK). В кроветворной системе молекула CD117 экспрессируется приблизительно на 50% клеток-предшественников CD34+, задействованных в эритроцитарной (7), миеломоноцитарной и мегакариоцитарной дифференциации (3,8). Хотя CD117 в первую очередь является индикатором нелимфоидных клеток-предшественников, сообщалось о его выявлении на ранних лимфоидных клетках-предшественниках (8,9). Экспрессия CD117 была выявлена на небольшой подгруппе покоящихся NK-клеток (яркий CD56) и приблизительно на 30% незрелых CD3– CD4– CD8– тимоцитов (3). CD117 также экспрессируется на тучных клетках (3,8) и выявляется на некроветворных клетках, например, в репродуктивной системе, меланоцитах и эмбриональных клетках мозга (8).

MAb 104D2D1 было отнесено к CD117 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: C-30. Секция C) (8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (10). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD117+ M07E Cell Line	3,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
CD117+ M07E Cell Line	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD25
Клон	B1.49.9
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Alloactivated T lymphocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
концентрация	APC-AlexaFluor700 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	720 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD25-APC
-Alexa Fluor 700

REF B92454 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD25 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Гетеротримерный рецептор IL2 (IL2RA, IL2RB и IL2RG) играет важную роль в поддержании работы иммунной системы (1,2). Для аналитической проточной цитометрии антиген CD25 играет критически важную роль в идентификации ряда фенотипических подмножеств, включая активированные Т-клетки, Т Reg-клетки, и дифференциальной диагностике лимфопролиферативных заболеваний и других функциональных субпопуляций (3).

Активированные Т-клетки можно отслеживать методом проточной цитометрии на основании поверхностных молекул, для которых обычно характерно повышающее регулирование, например CD25 (4). Действие иммуносупрессивных препаратов на активацию Т-клеток можно зарегистрировать непрямым анализом клеточной функции или прямым мониторингом активированных Т-клеток в цельной крови методом проточной цитометрии. Регуляторные Т-клетки (Treg-клетки), определяемые при экспрессии CD4(+) CD25(+), фактора транскрипции, FoxP3, выявляют супрессорную активность (5). IL2RA конституционно экспрессируется на регуляторных Т-клетках. Супрессорная активность Treg-клеток является как контактно-зависимой, так и цитокин-независимой. Treg-клетки играют центральную роль в поддержании аутотолерантности и гомеостаза ткани. Нарушение Treg сообщалось при ряде аутоиммунных состояний у человека. Истощение Treg-клеток приводит к возникновению множества аутоиммунных заболеваний (6,7).

Treg-клетки вносят важный вклад в развитие иммунной толерантности к опухолям и играют критическую роль в индукции толерантности к ассоциированным с опухолями антигенам и подавлении противоопухолевого иммунитета. Истощение Treg-клеток или блокирование их роли подавления иммунитета может усилить противоопухолевое действие. Недавние свидетельства предполагают, что Treg-клетки могут отвечать за сбой противоопухолевого иммунитета хозяина вследствие подавления цитотоксических Т-клеток (8,9). Естественным образом возникающие Treg-клетки поддерживают иммунологическую аутотолерантность и предотвращают ряд аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и системная красная волчанка. Treg-клетки использовались для лечения клинически аутоиммунного ревматоидного заболевания путем наращивания натуральных специфичных к аутоантигенам Treg-клеток ex vivo и последующего переноса обратно к хозяину. Во всех этих процедурах важную роль играют использование и обнаружение клеток CD25+ (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавляют 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Обладающий высоким сродством рецептор IL-2 (IL-2R) представляет собой тримерный комплекс, состоящий из трех полипептидных цепей, α (IL-2Rα, Tac, p55 или CD25), β (IL-2Rβ, p75 или CD122) и γ (IL-2Rγ или p64). Т-лимфоциты экспрессируют рецептор IL-2, обладающий промежуточным сродством, который представляет собой комплекс β/γ или α/γ цепей. Цепи IL-2Rβ и IL-2Rγ принимают участие в опосредованном IL-2 клеточном сигнальном пути (11,12,13). Молекула CD25 (известная как Tac-антиген и рецептор интерлейкина-2 α IL-2Rα) в большом количестве экспрессируется на регуляторных CD4-положительных Т-лимфоцитах и не обнаруживается на покоящихся CD8-положительных лимфоцитах. Однако все активированные Т-лимфоциты экспрессируют белок CD25. Подмножество В-лимфоцитов (CD20-положительных) экспрессирует антиген CD25. Гранулоциты, моноциты, NK-клетки, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют CD25 (11).

Моноклональное антитело (mAb) B1.49.9 было отнесено к кластеру дифференцирования CD25 на 2nd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (2-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: T141, секция T) (14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD25+ K562.CD25.1 Cell Line	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток K562-CD25.1 в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
CD25+ K562.CD25.1 Cell Line	10	99,51	99,21	0,12	0,13	0,12	0,13

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor700 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor700 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor700 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD25
Клон	B1.49.9
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Alloactivated T lymphocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD25-PC5.5

REF B92458 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD25 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Гетеротримерный рецептор IL2 (IL2RA, IL2RB и IL2RG) играет важную роль в поддержании работы иммунной системы (1,2). Для аналитической проточной цитометрии антиген CD25 играет критически важную роль в идентификации ряда фенотипических подмножеств, включая активированные Т-клетки, Т Reg-клетки, и дифференциальной диагностике лимфопролиферативных заболеваний и других функциональных субпопуляций (3).

Активированные Т-клетки можно отслеживать методом проточной цитометрии на основании поверхностных молекул, для которых обычно характерно повышающее регулирование, например CD25 (4). Действие иммуносупрессивных препаратов на активацию Т-клеток можно зарегистрировать непрямым анализом клеточной функции или прямым мониторингом активированных Т-клеток в цельной крови методом проточной цитометрии. Регуляторные Т-клетки (Treg-клетки), определяемые при экспрессии CD4(+) CD25(+), фактора транскрипции, FoxP3, выявляют супрессорную активность (5). IL2RA конституционно экспрессируется на регуляторных Т-клетках. Супрессорная активность Treg-клеток является как контактно-зависимой, так и цитокин-независимой. Treg-клетки играют центральную роль в поддержании аутотолерантности и гомеостаза ткани. Нарушение Treg сообщалось при ряде аутоиммунных состояний у человека. Истощение Treg-клеток приводит к возникновению множества аутоиммунных заболеваний (6,7).

Treg-клетки вносят важный вклад в развитие иммунной толерантности к опухолям и играют критическую роль в индукции толерантности к ассоциированным с опухолями антигенам и подавлении противоопухолевого иммунитета. Истощение Treg-клеток или блокирование их роли подавления иммунитета может усилить противоопухолевое действие. Недавние свидетельства предполагают, что Treg-клетки могут отвечать за сбой противоопухолевого иммунитета хозяина вследствие подавления цитотоксических Т-клеток (8,9). Естественным образом возникающие Treg-клетки поддерживают иммунологическую аутотолерантность и предотвращают ряд аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и системная красная волчанка. Treg-клетки использовались для лечения клинически аутоиммунного ревматоидного заболевания путем наращивания натуральных специфичных к аутоантигенам Treg-клеток ex vivo и последующего переноса обратно к хозяину. Во всех этих процедурах важную роль играют использование и обнаружение клеток CD25+ (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

Процедура с реагентом VersaLyse

ПРОЦЕДУРА

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавляют 100 мкл исследуемой пробы в каждую из тестовых пробирок. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Обладающий высоким сродством рецептор IL-2 (IL-2R) представляет собой тримерный комплекс, состоящий из трех полипептидных цепей, α (IL-2Rα, Tac, p55 или CD25), β (IL-2Rβ, p75 или CD122) и γ (IL-2Rγ или p64). Т-лимфоциты экспрессируют рецептор IL-2, обладающий промежуточным сродством, который представляет собой комплекс β/γ или α/γ цепей. Цепи IL-2Rβ и IL-2Rγ принимают участие в опосредованном IL-2 клеточном сигнальном пути (11,12,13). Молекула CD25 (известная как Tac-антиген и рецептор интерлейкина-2 α IL-2Rα) в большом количестве экспрессируется на регуляторных CD4-положительных Т-лимфоцитах и не обнаруживается на покоящихся CD8-положительных лимфоцитах. Однако все активированные Т-лимфоциты экспрессируют белок CD25. Подмножество В-лимфоцитов (CD20-положительных) экспрессирует антиген CD25. Гранулоциты, моноциты, NK-клетки, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют CD25 (11).

Моноклональное антитело (mAb) B1.49.9 было отнесено к кластеру дифференцирования CD25 на 2nd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (2-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: T141, секция T) (14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD25+ K562.CD25.1 Cell Line	2,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток K562-CD25.1 в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
CD25+ K562.CD25.1 Cell Line	10	99,73	99,33	0,06	0,06	0,06	0,06

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ Leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-AlexaFluor750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-APC
-Alexa Fluor 750

REF B92463 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD34 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от BM-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

В целом, CD34 рассматривается как поверхностный антиген, подходящий для селекции субпопуляций клеток-предшественников из более крупных клеточных популяций, в том числе клеток мезенхимы, и не связанный только с гематопоэтическими и эндотелиальными клетками (13). Клетки CD34+ из многих типов ткани могут представлять собой источник клеток-предшественников, которые могут использоваться клинически в регенеративных медицинских стратегиях (14, 15).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-AlexaFluor750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (16).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (17). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD34+ KG1A Cell Line	3,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
CD34+ KG1A Cell Line	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-AlexaFluor750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-AlexaFluor750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-AlexaFluor750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Alexa Fluor является товарным знаком компании Molecular Probes Invitrogen Company.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD63
Клон	CLB-Gran/12
Гибридома	SP2/0 x (balb/c x AJ)
Иммуноген	Human cytochrome B enriched cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,5 - 7,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD63-FITC

REF B92467 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD63 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Функционально, тетраспанины вовлечены в разнообразные процессы, такие как активация и пролиферация клеток, адгезия и подвижность, дифференциация и раковый рост (меланома) (1,2). Недавно CD63 вместе с CD203c были продемонстрированы как специфические маркеры активации базофилов, которые быстро активируются после воздействия аллергена у сенсибилизированных пациентов. Эти иммунофенотипические изменения могут быть обнаружены на основе одной клетки методом многоцветной проточной цитометрии с использованием специфических моноклональных антител в тесте активации базофилов (BAT) (3,4,5,6).

Экспрессия CD63 и фосфорилирование p38 MAPK также могут быть проанализированы методом проточной цитометрии в прошедших селекцию по антителам к IgE базофилам для диагностики аллергии и предлагают новые идеи относительно механизмов активации базофилов (7). Активацию тромбоцитов можно оценить путем измерения экспрессии CD63 и CD62P (P-селектин) на поверхности клеток методом проточной цитометрии (8).

Тетраспанины дифференциально экспрессируются подмножествами моноцитов во время воспалительного процесса. Созревание моноцитов приводило к увеличению экспрессии CD9 и явному перемещению CD63 и CD53 с поверхности на внутриклеточные мембраны, как продемонстрировано тестированием методом проточной цитометрии (9). Наконец, мембранный белок CD63 из семейства тетраспанинов опосредует как раннюю, так и пост-интеграционную стадии цикла репликации HIV-1. CD63 вовлечен в процессы проникновения вируса или обратной транскрипции, его экспрессия является ключевой для эффективной репликации в первичных Т-клетках $CD4^+$. Обобщенно, CD63 способствует опосредованному Env слиянию, а также интеграции вируса на более поздних циклах репликации HIV-1 (10,11,12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07795).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD63, также известный как гликопротеин лизосомальной мембраны 3 (LAMP3), является членом семейства тетраспанинов (TM4SF) (13). Недавно сообщалось, что CD63, как другие тетраспанины (CD9, CD81, CD82), формирует комплексы с VLA-3 и фосфатидилинозитол 4-киназой (14,15), с VLA-6 (16), CD11/CD18 и тирозинкиназой (17). CD63 был впервые описан в гранулах покоящихся тромбоцитов и на поверхностной мембране активированных тромбоцитов (18). Молекулярная масса тромбоцитарной формы CD63 находится в диапазоне от 40 до 55 кДа (19).

CD63 был обнаружен на поверхности и в цитоплазме многих клеток (19,20,21,22,23,24). Его экспрессия на поверхности ассоциирована с секрецией лизосом: CD63, присутствующий только в азурофильных гранулах нестимулированных нейтрофилов, интенсивно экспрессируется на поверхности нейтрофилов после активации (19,21); этот феномен также сообщался для базофилов (22,23).

Моноклональное антитело (mAb) CLBGran/12 реагирует с большинством периферических клеток крови, включая активированные тромбоциты, лимфоидные, миелоидные и эндотелиальные клетки, за исключением эритроцитов и покоящихся Т-клеток. Моноклональное антитело (mAb) CLBGran/12 было отнесено к кластеру дифференциации CD63 во время семинара IVth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (IV международный семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Vienna, Austria, в 1989 г. (19) (другие обозначения: mAb435 (19), CLB-435 (21) или CLB-CD63 (23)).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (25). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD63-FITC+	1,0 cell/µL
Monocytes CD63-FITC+	1,0 cell/µL
Granulocytes CD63-FITC+	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD63-FITC+	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Monocytes CD63-FITC+	10	99,93	99,38	0,11	0,30	0,11	0,30
Granulocytes CD63-FITC+	10	100,00	99,99	0,00	0,01	0,00	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD200
Клон	OX-104
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human OX2CD4d3+4 soluble fusion protein
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD200-PC7

REF B92472 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD200 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD200 и CD200R выполняют несколько функций в регулировании воспалительного взаимодействия путем стимуляции ингибиторных действий иммунной системы (1,2). Взаимодействие между CD200/CD200R приводит к активации внутриклеточного ингибиторного пути с набором RasGAP, и таким образом вносит свой вклад в ингибирование эффекторных клеток. Было подтверждено, что активация CD200R стимулирует дифференциацию Т-клеток в подмножество Treg, увеличивает активность индолеамин 2,3-диоксигеназы, модулирует цитокиновую среду с модели Th1 на модель Th2 и способствует синтезу противовоспалительных IL-10 и TGF-β (3). CD200/CD200R необходим для поддержания аутотолерантности.

Многие исследования продемонстрировали большое значение CD200 для контроля аутоиммунной реакции, воспаления, формирования и распространения рака, гиперчувствительности и спонтанной потери плода (3,4,5,6,7,8). Окрашивание CD200 методом проточной цитометрии может быть полезным при дифференциальной диагностике В-клеточных новообразований (9,10,11,12,13). В частности, CD200 способствует дифференциальной диагностике между CLL и MCL (14). Понижающее регулирование CD200 на В-клетках и молекул PD1 на Т-клетках связано с улучшением распространения специфичных к CD19 Т-клеток CAR (CTL-19) после пяти или более циклов терапии ибрутинибом (15,16,17).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD200 (OX2) является очень консервативным мембранным гликопротеином, который принадлежит к суперсемейству Ig (IgSF) и содержит два иммуноглобулин-подобных домена (V, C), один трансмембранный и короткий цитоплазматический домен (18,19). Разнообразные типы клеток экспрессируют CD200 на поверхности, включая тимоциты, B-клетки, активированные T- и B-клетки, дендритные клетки, нейроны и эндотелиальные клетки (19,20). CD200 и CD200R являются очень консервативными мембранными гликопротеинами I типа, которые представляют взаимодействие, основанное на N-концевых иммуноглобулин-подобных доменах (21). В то время как распределение экспрессии CD200 очень широкое, CD200R преимущественно экспрессируется в миелоидных и лимфоидных клетках.

Моноклональное антитело (mAb) OX-104 распознает человеческий гликопротеин OX2 (22). Оно было отнесено к CD200 во время семинара 7th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (7-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Adelaide, Australia, в декабре 2004 г. (код WS: 70655, NL9) (18)

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (23). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD200-PC7+	8,0 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Образец 2
Lymphocytes CD200-PC7+	10	38,47	20,84	0,77	0,45	2,00	2,15

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (24).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (25).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD10
Клон	ALB1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human Leukemia Cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD10-PC7

REF B96750 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD10 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD10, который также носит название неприлизин, представляет собой металлоэндопептидазу клеточной поверхности с молекулярным весом 100 кД, которая инактивирует множество биологически активных пептидов. Первоначально он был идентифицирован как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA) и считался опухоль-специфическим. Антиген CD10 экспрессируется на поверхности множества нормальных и опухолевых клеток (1, 2). CD10 обнаруживается на клетках острого лимфоидного лейкоза (ALL), клетках, которые происходят от предшественников В-лимфоцитов, и сообщалось, что он экспрессируется на клетках лимфобластной лимфомы, лимфомы Беркитта и фолликулярной лимфомы, на поверхности нормальных ранних лимфоидных клеток-предшественников, незрелых В-клеток в костном мозге взрослых и В-клетках зародышевого центра в лимфоидной ткани (3, 4).

CD10 с экспрессией ICOS позволяет дифференцировать ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL) от других Т-клеточных лимфом (CD10–) (5; 6). Кроме того, CD10 может помочь дифференцировать лимфому Беркитта (BL) и CD10+ диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (7, 8). В дополнение к ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме, лимфоме Беркитта и диффузной В-крупноклеточной лимфоме, другие лимфомы могут быть CD10+, такие как лимфома из клеток мантии (9), маргинальной зоны (10) и редкие CD5+ CD10+ лимфомы (11).

Оценка экспрессии CD10 с использованием многопараметрической проточной цитометрии с анализом кластеров является высокочувствительной и специфической для диагностики фолликулярной лимфомы, в частности, когда недостаточно ткани для заключительного диагноза (12). CD10 обычно отрицательный при AML, CLL, EBV+ лимфопролиферативных заболеваниях, лимфоплазмоцитарном, из клеток мантии и маргинальной зоны. Яркая экспрессия CD10, связанная с ярким Bcl-2, может представлять колонизацию фолликулярной лимфомы, поэтому рекомендуется определение стадии опухоли (13).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Ген CALLA кодирует трансмембранный гликопротеин II типа с молекулярным весом 100 кД. Родственные CALLA последовательности ДНК обнаружены на хромосоме человека 3J (14). CALLA, (CD10), был описан как поверхностный фермент, экспрессируемый на ранних лимфоидных клетках-предшественниках и нейтрофилах, и был идентифицирован как металлопротеаза цинка, нейтральная эндопептидаза 24.11 (NEP, «энкефалиназа»). Известно, что фермент CD10 гидролизирует множество биологически активных пептидов, в том числе мет-энкефалин, формил-Met-Leu-Phe (f-MLP) и вещество P, которые участвуют в процессе дифференцировки и созревания клеток.

Моноклональные антитела ALB1 были изучены во время первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1st HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г. (15).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (16). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Granulocytes CD10-PC7+	4 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Granulocytes CD10-PC7+	10	95,18	84,88	0,43	0,37	0,45	0,44

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD117
Клон	104D2D1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	MOLM-1 leukaemic cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD117-PC5.5

REF B96754 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD117 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Поскольку его экспрессия происходит именно на ранней стадии гематопоэза, CD117 может быть индикатором острого лейкоза, особенно миелоидной линии (1-2). В небольшом числе случаев острого Т-лейкоза (T-ALL) сообщалось о положительной реакции на CD117, а экспрессия CD117 в случае В-клеток-предшественников-ALL встречается редко (1,3). Исследования показали, что CD117 может быть связан с мастоцитозом (3,4). Одновременный анализ антигенов CD34 и CD117 помогает в определении бластных клеток миелоидного происхождения: степень незрелости определяется экспрессией CD34, а миелоидное происхождение — коэкспрессия CD117 (1,3,5,6,2,4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A62833).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD117, также известен как рецептор фактора стволовых клеток (SCFR), комплект тучных клеток и рецептор стального фактора, представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 145 kDa, зашифрованный набор протоонкогена (1). Молекула CD117 относится к семейству рецепторной тирозинкиназы класса III (RTK). В кроветворной системе молекула CD117 экспрессируется приблизительно на 50% клеток-предшественников CD34+, задействованных в эритроцитарной (7), миеломоноцитарной и мегакариоцитарной дифференциации (3,8). Хотя CD117 в первую очередь является индикатором нелимфоидных клеток-предшественников, сообщалось о его выявлении на ранних лимфоидных клетках-предшественниках (8,9). Экспрессия CD117 была выявлена на небольшой подгруппе покоящихся NK-клеток (яркий CD56) и приблизительно на 30% незрелых CD3– CD4– CD8– тимоцитов (3). CD117 также экспрессируется на тучных клетках (3,8) и выявляется на некроветворных клетках, например, в репродуктивной системе, меланоцитах и эмбриональных клетках мозга (8).

MAb 104D2D1 было отнесено к CD117 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: C-30. Секция C) (8).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (10). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
CD117+ M07E Cell Line	3 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток CD117+ M07E в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
CD117+ M07E Cell Line	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	HLA-DR
Клон	Immu-357
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	EBV-transformed cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,0 - 7,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-HLA-DR-FITC

REF B96758 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих HLA-DR антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула HLA-DR представляет собой полезный индикатор для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании в рамках расширенной панели иммунофенотипирования. Анализ экспрессии антигена HLA-DR позволяет определить бластные клетки миелоидного происхождения. Их часто наблюдаемый фенотип: HLA-DR+ CD7– CD45weak. Однако гипергранулярные лейкозы промиелоцитарного типа (подгруппа LAM-M3) характеризуются слабой экспрессией индикатора HLA-DR или ее полным отсутствием (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07795).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Моноклональное антитело Immu357 распознает эпитоп, который переносится на мономорфном белке в 29 – 33 kDa, идентифицируемый как HLA-DR. Система HLA (антиген лейкоцитов человека) – название главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Зашифрованные 5 локусами (DM, DO, DP, DQ и DR) локуса D молекулы HLA класса II также называют антигенами HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (2,3). Экспрессия антигенов класса II ограничена антиген-презентирующими клетками, то есть B-лимфоцитами, моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса кожи (3,4). На тимоцитах антиген HLA-DR экспрессируется только после активации (5). Стволовые клетки и кроветворные клетки-предшественники экспрессируют его до определенной стадии своей дифференциации (3,6).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (7). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes HLA-DR-FITC+	1 cell/µL
Monocytes HLA-DR-FITC+	2 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes HLA-DR-FITC+	10	18,43	30,03	0,88	0,61	4,78	2,04
Monocytes HLA-DR-FITC+	10	98,91	99,77	0,83	0,22	0,84	0,22

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD11c
Клон	BU15
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Dendritic cells from synovial fluid
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD11c-PC7

REF B96763 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD11c антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии CD11c используется для идентификации и характеристики гематологических нарушений (1,2,3,4), а также для диагностики волосатоклеточных лейкозов, некоторых В-клеточных лейкозов и определенных видов неходжкинских лимфом (2,4).

CD 11c применяется для фенотипирования циркулирующих в крови дендритных клеток, что было продемонстрировано для пациентов с миелоидным лейкозом (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ 737662).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD11c (альфаX субъединица/лейкоцитарный поверхностный антиген p150) представитель семейства интегринов. Как и другие лейкоцитарные интегрины (CD11a, CD11b, CD11d), CD11c нековалентно связан с интегрином субъединицей бета2 (CD18) (6,7).

CD11c экспрессируется главным образом на моноцитах, макрофагах, естественных киллерах, в большей степени на гранулоцитах, дендритных клетках, некоторых субпопуляциях Т- и В-клеток (8,9).

CD11c присвоен моноклональным антителам BU15 (6) на 3-м совещании по антигенам дифференцировки человека, состоявшемся в 1986 в Оксфорде, (WS Code 256 Section M) (10).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD11c-PC7+	11 cells/µL
Monocytes CD11c-PC7+	1 cell/µL
Granulocytes CD11c-PC7+	5 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD11c-PC7+	10	30,65	19,48	0,44	0,47	1,43	2,44
Monocytes CD11c-PC7+	10	99,24	98,16	0,42	0,97	0,42	0,98
Granulocytes CD11c-PC7+	10	99,96	99,97	0,02	0,01	0,02	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD64
Клон	22
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
концентрация	APC-A750 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	775 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD64-APC
-Alexa Fluor 750

REF B96769 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD64 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Экспрессия CD64 в активированных полиморфно-ядерных лейкоцитов (PMN) считается одним из наиболее достоверных маркеров для распознавания тяжелых инфекций/сепсиса (1,2). Раннее определение сепсиса является очень важным для оказания своевременного лечения и оптимизации выживаемости (3). Экспрессия CD64 на нейтрофилах существенно увеличивается у новорожденных с сепсисом и является очень эффективным маркером для ранней диагностики неонатальной инфекции одним определением, по сравнению с другими воспалительными маркерами (4). Несколько групп уже приняли проточный цитометр в качестве средства диагностики для раннего выявления сепсиса с использованием CD64 на нейтрофилах у новорожденных в качестве биомаркера (5,6).

Более того, исследования показали, что сочетание нейтрофилов CD64 с другими маркерами сепсиса, например IL-10, IL-6, CRP и прокальцитонин, повышают чувствительность и специфическую прогностическую ценность (7,8,9). Нейтрофил CD64 был указан в качестве маркера для мониторинга активности инфекции нетуберкулезными микобактериями (NTM) у пациентов с ревматоидным артритом (10). Кроме того, экспрессия CD64 на нейтрофилах и моноцитах была показана как маркер при диагностировании пациентов с периодической лихорадкой, афтозным стоматитом, фарингитом и шейным аденитом (PFAPA), вместе с другими аутовоспалительными заболеваниями, демонстрирующими периодическую лихорадку, и бактериальными инфекциями (11). Позднее сообщалось, об использовании CD64 как новой мишени для лечения хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML) и острого миеломоноцитарного лейкоза (AMML) (12).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC-A750 : Реактив IOTest (Ref. A79393).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A79393).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD64 является интегральным мембранным гликопротеином, который также является Fc-рецептором, который связывает высокоаффинные мономерные антитела типа IgG (13). Он также называется Fc-гамма рецептором 1 (FcγRI) или FCRI. После связывания IgG CD64 взаимодействует с гамма-цепью и запускает активацию клеток (14). С точки зрения структуры, CD64 состоит из сигнального пептида, что позволяет передавать его на поверхность клетки, трех внеклеточных иммуноглобулиновых доменов типа C2, которые используются для связывания антитела, гидрофобного трансмембранного домена и короткого цитоплазматического фрагмента (15).

CD64 постоянно встречается в макрофагах и моноцитах. CD64 экспрессирован в ранних миелоидных клетках, а также в ПМЯ, активированных IFNγ и G-CSF (15, 16). Моноклональное антитело 22 было отнесено к кластеру CD64 дифференцирования на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцирующему антигену лейкоцитов человека, который проводился в Вене, Австрия в 1989 г. (код WS: 96, секция: M) (17).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Monocytes CD64-APC A750+	1 cell/µL
Granulocytes CD64-APC A750+	2 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Monocytes CD64-APC A750+	10	99,02	98,76	0,27	0,37	0,27	0,38
Granulocytes CD64-APC A750+	10	99,92	99,73	0,02	0,06	0,02	0,06

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома APC-A750 также излучает свет при 660 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии APC-A750 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии APC-A750 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD79b
Клон	CB3-1
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Affinity purified Ig associated molecules
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD79b-APC

REF B96773 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD79b антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии CD79b с помощью проточной цитометрии используется при характеристике В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (1).

Также этот маркер применяется при дифференциальной диагностике В-клеточных неоплазий для исключения миелоидных и Т-клеточных опухолей. Кроме того, CD79a используется для диагностики пре-В острого лимфобластного лейкоза (пре-В-ОЛЛ), так как многие из этих опухолей негативны по другим В-клеточным маркерам (2).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ IM2475).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD79b является частью дисульфидносвязанного гетеродимера, нековалентно прикрепленная к поверхности иммуноглобулинов для формирования рецепторов B-клеток. (BCR) (3).

Молекулярный вес CD79b приблизительно от 33 до 40 kDa при восстановленных условиях (3).

Экспрессия CD79b имеет место на ранних стадиях B-клеточного онтогенеза, ограничена B-лимфоцитами, впервые появляясь на поверхности на стадии пре-B клеток и сохраняясь на протяжении всех стадий дифференцировки B-клеток вплоть до плазматических клеток (4). CD79b играет важную роль в регуляции функции антигенных рецепторов так же как субъединицы CD3 с TCR на T-лимфоцитах (4).

CD79b был присвоен моноклональным антителам CB3-1 на 6-м совещании по антигенам дифференцировки человека в городе Кобе (Япония) в 1996 году. (W.S. Code: CD79.1, Section B) (3).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (5). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD79b-APC+	1,0 cell/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD79b-APC+	10	13,79	9,57	0,54	0,20	3,92	2,04

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD22
Клон	SJ10.1H11
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human NALM1 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD22-APC

REF B96777 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD22 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD22 выявляется в цитоплазме рано в онтогенезе B-клетки (поздняя pro-B стадия), появляется на поверхности клетки одновременно с экспрессией мембранного IgD и обнаруживается на большинстве зрелых B-лимфоцитов (1,2). Антиген CD22 исчезает на конечных стадиях дифференциации до стадии плазматических клеток (1). В периферической цельной крови экспрессия антигена CD22 ограничена B-лимфоцитами. Антиген CD22 полезен при фенотипировании большинства лейкозов B-клеток и почти всех лимфом B-клеток в сочетании с другими маркерами (3).

Кроме того, антиген CD22 в сочетании с антигеном CD11c представляет собой уникальный индикатор лейкоза ворсистых клеток (HCL), хотя ни один из этих антигенов не является специфичным для этого заболевания (4, 5). Случаи HCL демонстрируют уникальный рисунок гистограммы флуоресценции CD22+CD11c+, характеризующийся равномерно интенсивной флуоресценцией CD11c и CD22.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ IM2475).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD22 представляет собой одноцепочечную трансмембранную молекулу типа I с молекулярным весом в 130 – 140 kDa, состоящую из семи иммуноглобулино-подобных (Ig-подобных) областей (1). Поскольку эти области, входящие в суперсемейство иммуноглобулинов (IgSF), демонстрируют свойства белков, связывающих сиаловую кислоту, CD22 входит в семейство сиалоадгезинов, как и CD33 и связанный с миелином гликопротеин (MAG) (6). N-терминальная область, дистальная по отношению к мембране, представляет собой Ig-область V-типа, в то время как другие шесть областей, проксимальные по отношению к мембране, представляют собой Ig-области C2-типа (6). Цитоплазматическая область CD22 включает шесть тирозинов, представляющих собой возможные цели для фосфорилирования. Некоторые области внутрицитоплазматического хвоста представляют гомологию мотивов активации на основе тирозина (ITAM), некоторые другие – с мотивами ингибиции на основе тирозина (ITIM) (6,7). CD22 оказывается последовательно связанным с BCR (рецептор антигена B-клетки), и это может включать распознавание CD22 детерминант углеводов mIgM (8,9,10). CD22 является посредником при адгезии взаимодействия B-B лимфоцитов, а также B-клеток и взаимодействия эритроцитов и лейкоцитов (6,9,11,12).

Моноклональное антитело SJ10.1H11 было отнесено к кластеру дифференциации CD22 на втором Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Бостоне (1984) (13).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (14). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD22-APC+	2 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD22-APC+	10	14,13	9,81	0,43	0,26	3,04	2,66

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	FMC7
Клон	FMC7
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human B lymphoblastoid cell line, HRIK
Иммуноглобулин	IgM
Вид	Мышь
Очистка	Гель-фильтрация хроматографии
Флуорохром	Pacific Blue
концентрация	Pacific Blue / Ig: 17 - 21
λ возбуждения	405 nm
Пик эмиссии	455 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-FMC7-Pacific Blue

REF B96782 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих FMC7 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ распознанного антигена mAb FMC7 полезен для определения характеристик, подсчета и мониторинга популяций B-лимфоцитов (от FMC7+ до FMC7–) при злокачественной лимфоидной дискразии крови (напр., FMC7– для плазмоцитарной лейкемии, хронического B-клеточного лимфолейкоза (B-CLL) и FMC7+ для волосковоклеточного лейкоза, пролимфоцитарного лейкоза или неходжкинской лимфомы B-клеточного пути (B-клеточная NHL) (1,2,3,4,5,6,7).

FMC-7 используется в качестве стандартного маркера в системе оценки Matutes для дифференциации B-CLL и B-клеточного лейкоза другого типа (1,2,3,4,5,6,7); замещение FMC7 на CD20 приводит к снижению точности с 94,4% до 81,5%. Экспрессия FMC7 оказалась одним из наиболее надежных маркеров для различения B-CLL и других B-клеточных неоплазий. В B-клеточной NHL экспрессия CD20 коррелирует с FMC7, а также с другими B-клеточными маркерами (напр., CD22 и CD79b). Исследования продемонстрировали корреляцию между более низкой общей выживаемостью (ОВ) при диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфоме (DLBCL) и ее экспрессией FMC7– и CD20+ (8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

1. Добавьте соответствующий объем 10 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest в каждую тестовую пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген, распознанный моноклональным антителом (mAb) FMC7, представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярным весом 105 кДа (10,11). Антиген FMC7 был описан как частная конформация поверхностного белка, кодированного геном CD20 (12,13,14). Способность mAb FMC7 вступать в реакцию со своим частным эпитопом CD20 зависит от уровня холестерина в составе мембраны (13). В циркулирующих клетках крови mAb FMC7 распознает субпопуляцию B-лимфоцитов. Экспрессирование молекулы, распознанной FMC7, не обнаружено на T-лимфоцитах, NK-клетках, полиморфно-ядерных гранулоцитах, тромбоцитах или эритроцитах (15).

Субпопуляция B-лимфоцитов, распознанная антителом FMC7, экспрессирует поверхностные иммуноглобулины (9,(10,11; 15,16,17), определяя таким образом этап созревания B-лимфоцитов, не совпадающих с FMC7– B-лимфоцитами (15).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (18). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes FMC7-PB+	3 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes FMC7-PB+	10	8,24	18,78	1,07	0,87	13,04	4,65

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (19).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (20).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD138
Клон	B-A38
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	U266B1 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
концентрация	PC5,5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	692 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD138-PC5.5

REF B96786 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD138 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD138 ассоциирован с поздней стадией дифференциации B-клеток (плазматических клеток). CD138 не экспрессируется в созревающих/зрелых B-клетках. CD138 рассматривается как идентифицирующий признак для обнаружения плазматических клеток методом проточной цитометрии (1,2). CD138, в сочетании с другими CD, например, CD38, CD45, CD19, CD56, CD20, CD28, CD117, широко используется для идентификации заболеваний, связанных с плазматическими клетками, включая множественную миелому, моноклональную гаммапатию неустановленного значения (MGUS) и более редко плазмоклеточный лейкоз (3,4,5,6).

Другие комплементарные маркеры могут включать в себя CD30, CD44, CD81, CD105 и CD200. В настоящее время проводится ряд исследований для определения подходящих панелей для мониторинга методом проточной цитометрии минимального остаточного заболевания (MRD) после химиотерапии и аутотрансплантации гематопоэтических стволовых клеток (7,8).

Описано, что CD138 присутствует в определенным неходжкинских лимфомах и кератоакантомах, его экспрессия обратно коррелирует с агрессивностью опухоли и ее способностью к инвазии (9,10). Недавно была описана целевая терапия путем образования белка слияния IFNα2, нацеленного на клетки, экспрессирующие CD138, с тем ожиданием, что IFN ингибирует пролиферацию и вызовеьт апоптоз первичных клеток у пациентов с множественной миеломой (MM) (11).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5,5 : Реактив IOTest (Ref. A62833).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A62833).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики получены с использованием процедуры, описанной выше на пробах с добавлением клеточной линии в течение 24 часов после венепункции, ранее собранных в стерильные пробирки с солью EDTA как антикоагулянтом и хранившихся при 18–25°C. Анализ проводится в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD138 — синдекан-1 гепарансульфатпротеогликан с очень консервативным трансмембранным и цитоплазматическим доменом I типа и внеклеточным доменом различного размера, содержащим ковалентно связанные цепи гепарин сульфата. Синдекан играет роль в контроле роста, распространении клеток, клеточном распознавании, клеточной адгезии и сигнализации, возможно, в качестве ко-рецепторов с интегринами и молекулами межклеточной адгезии для регулирования клеточной сигнализации и организации цитоскелета (12,13).

Моноклональное антитело B-A38 изучалось во время 8th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (8-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека — HLDA), который проводился в Adelaide, Australia, в 2004 г. (14).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (15). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
U266B1+ CD138-PC5.5+	2 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентное соотношение положительных событий было измерено с десятью повторами с использованием линии положительных клеток U266B1 в тот же день и на том же цитометре.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
U266B1+ CD138-PC5.5+	10	100,00	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (16).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (17).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5,5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5,5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5,5 конъюгата.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD27
Клон	1A4CD27
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	PHA stimulated human T cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD27-PE

REF B96790 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Для диагностики *in vitro*.

НАЗНАЧЕНИЕ
Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD27 антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием 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.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD27 помогает дифференциировать Т-клетки памяти типа CD8+ (CD27+) от Т-клеток эффекторного типа CD8+ Т (CD27–). Взаимодействие CD27/CD70 регулирует пролиферацию В-клеток и дифференциацию Т-клетками, усиливает опосредуемые TCR пролиферативные сигналы и увеличивает эффекторную функцию (1). Сигнализация CD27 может либо улучшить функцию Т-клеток или привести к Т-клеточной дисфункции, в зависимости от продолжительности и условий лигирования рецептора CD70, модулирующего взаимодействие CD70–CD27. Это привлекательная стратегия для лечения солидных опухолей и определения непосредственной мишенью лейкозные стволовые клетки (2).

CD27 на В-клетках помогает дифференцировать В-клетки памяти (CD27+) от наивных В-клеток (CD27–) и регулирует активацию В-клеток и синтез иммуноглобулина. CD27 обычно используется как маркер для В-клеток памяти с переключением и без переключения синтеза классов (CD27+IgD– и CD27+IgD+), он используется для классификации дефицитов В-клеток, включая разные распространенные иммунодефициты (3). В связи с ролью CD27 в пролиферации и цитотоксической активности, специфическое моноклональное антитело CD27 было испытано как агонист в моделях опухолей и продемонстрировало сильную стимулирующую и антинеопластическую активность (4). Отсутствие CD27 является отличительной чертой лейкоза ворсистых клеток среди В-клеточных злокачественных новообразований (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки: Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493) .
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Процедура с реагентом VersaLyse

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A07796).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента 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.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).

   0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

CD27 является членом семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) (6). Структурно оно является трансмембранной молекулой I типа (270 аминокислот). Внеклеточный домен имеет три связанных участка гликирования. На Т-клетках CD27 преимущественно экспрессирует на подмножестве наивных клеток CD45RA+CD45RO– Т-лимфоцитов CD4+, тогда как у большинства Т-клеток памяти (CD45RA– CD45RO+) отсутствует CD27 (7). Гликопротеин CD27 располагается на медуллярных тимоцитах, периферических Т-клетках, подмножестве зрелых В-клеток и NK-клеток (8,9). Активация Т-клеток, при вовлечении молекулы CD27, приводит к повышающему регулированию экспрессии CD27 как встроенного в клеточную поверхность, а также к высвобождению растворимой формы CD27 (sCD27) (6,7,10).

Моноклональное антитело (mAb) 1A4CD27 было отнесено к кластеру дифференцирования CD27 во время 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1993 г. (8,9).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ VERSALYSE

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (11). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Целевая популяция	Предел обнаружения
Lymphocytes CD27-PE+	6 cells/µL

ТОЧНОСТЬ

ТОЧНОСТЬ С VERSALYSE

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра.

Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)		Станд. откл. (SD)		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Lymphocytes CD27-PE+	10	69,94	57,03	0,84	0,77	1,21	1,35

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD71
Клон	YDJ1.2.2
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD71, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Рецептор трансферрина (CD71) экспрессируется на пролиферирующих клетках, включая неопластические, активированных лимфоцитах и предшественниках гемопоэтических клеток. Исследование экспрессия CD71 проводится при иммунофенотипировании миелодиспластических синдромов (1), а также для дифференцирования клеток матери и плода (2).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD71, известная как рецептор трансферрина или T9 антиген – гомодимерный трансмембранный гликопротеин с весом 190 kDa (3). CD71 вовлечен в поглощении железа при связывании трансферрина (4). Экспрессируется ретикулоцитами, эритроидными предшественниками и эндотелиальными клетками капилляров мозга (4,5). Все другие типы клеток экспрессируют CD71 только когда пролиферируют (4).

CD71 был присвоен моноклональным антителам YDJ1.2.2 на 5-м совещании по антигенам дифференцировки человека, состоявшемся в 1993 в Бостоне, США WS Code: A006, Section AA6) (3).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((JURKAT)) и клетки отрицательной линии ((FRN3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD71-FITC	Y = 0,9915 X +1,082	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD23
Клон	9P25
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	EBV transformed lymphoblastoïd cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4 - 5,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD23-FITC

REF IM0529 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD23, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD23 экспрессирует на активированных зрелых B-клетках, экспрессирующих IgM или IgD, на активированных моноцитах / макрофагах, субпопуляциях T-клеток, тромбоцитах, эозинофилах, клетках Лангерганса, фолликулярных дендритных клетках (CD23 совместно с CD21, CD35) и эпителии кишечника (1, 2, 3). Напротив, отсутствие экспрессии CD23 на базофилах, покоящихся B-клетках, B-клеточных лимфомах (лимфома Беркитта, лимфома по типу лимфомы Беркитта), фолликулярной лимфоме, лимфоме из клеток мантии и лимфоме маргинальной зоны представляет отдельный фенотип для дифференциальной диагностики. CD23 выступает как фактор роста и активации B-клеток, способствуя дифференцировке в плазматические клетки. Возможна секреция укороченной молекулы. В таком случае она функционирует как мощный митогенный фактор роста (sCD23). Растворимая форма также контролирует синтез IgE и гомеостаз в B-клетках (4, 5). Мембранная форма CD23 регулирует синтез IgE через связывание CD21 и IgE.

CD23 опосредует многочисленные связанные с IgE иммунные ответы (включая фокусирование на аллергене) путем увеличения презентации комплекса антигенов IgE, регулирования синтеза IgE, влияния на клеточную дифференциацию и рост как B-, так и T-клеток, а также стимулирования выработки провоспалительных медиаторов от моноцитов/макрофагов, эозинофилов и даже клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей. Моноклональное антитело (MAb), направленное на CD23, является многообещающей перспективной терапией при аллергических заболеваниях (моноклональное антитело к CD23 — Лумиликсимаб) (6). Обычно лимфома из клеток мантии (MCL) является отрицательной на CD23 или содержит малое его количество, в то время как мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома/хронический лимфоцитарный лейкоз (SLL/CLL) являются CD23-положительными. Различие между SLL/CLL и MCL имеет важное клиническое значение в отношении прогноза и терапии, и MCL, экспрессирующая CD23+, может быть связана с лучшим прогнозом (7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD23-FITC+	50	7,70	4,05	53,0

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD23 — трансмембранный гликопротеин с молекулярным весом 45 кДа, пространственно связанный с главным комплексом гистосовместимости (MHC) II класса. Молекула CD23, именуемая также FcgammaRII, является низкоафинным рецептором для IgE. Антиген CD23 экспрессируется главным образом на B-лимфоцитах и моноцитах. Он также присутствует на клетках других типов, таких как T-лимфоциты, эозинофилы, тромбоциты, клетки Лангерганса, субпопуляция тимических эпителиальных клеток и нейтрофилы. На B-лимфоцитах экспрессия CD23 повышается при активации и в полностью исчезает при дифференцировке до секретирующих плазмоцитов. Существует растворимая форма CD23 (sCD23), она может (как и CD23) быть вовлечена в регуляцию синтеза IgE и в процессы воспаления (10, 11)

Моноклональным антителам 9P25 кластер дифференцировки CD23 был присвоен на 6-м совещании по дифференцировочным антигенам человека (6th HLDA Workshop) в Кобе, Япония в 1996 (WS Code: CD23.1, Section B) (12).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD23-FITC +	12	7,25	0,33	4,49

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RPMI8866)) и клетки отрицательной линии ((FRN3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD23-FITC	Y = 0,9936 X - 0,7529	0,9997

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (13).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (14).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD11b
Клон	Bear1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Purified human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4-6
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD11b-FITC

REF IM0530 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD11b, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD11b полезен для выявления и определения нарушений со стороны кроветворной системы (1, 2, 3). Молекула CD11b экспрессируется при остром монобластном лейкозе и остром моноцитарном лейкозе. Аномалии экспрессии CD11b имеют прогностическое значение при миелодиспластических синдромах (MDS). Пациенты с низким процентом клеток костного мозга, экспрессирующих CD11b, подвержены более высокому риску эволюции в острый миелоидный лейкоз по сравнению с пациентами, у которых более 53% клеток костного мозга экспрессируют CD11b (1). Кроме того, CD11b иногда наблюдается на Т-клетках лейкоза больших гранулярных лимфоцитов (4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 2, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 2 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.
10. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого 0,5 мл или 1 мл ФСБ. Препараты следует исследовать в течение 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11b-FITC+	10	28,92	7,52	26,0

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11b-FITC+	10	99,43	0,42	0,40

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11b-FITC+	10	98,71	2,25	2,30

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD11b также имеет несколько других названий, например интегриновая цепь alpha-M, Mac-1, CR3, iC3bR или Mo1 (5, 6). Он представляет собой интегральный трансмембранный гликопротеин типа I на 170 – 165 kDa в восстановительных/невосстановительных условиях соответственно. CD11b демонстрирует 19 потенциальных центров N-гликолизирования (5).

Экспрессия цепи CD11b на поверхности клетки требует присутствия антигена CD18 (также известного как интегриновая цепь beta2). Эти две субъединицы сочетаются и создают интегрин CD11b/CD18, один из 4 интегриновых гетеродимеров, которые можно построить путем ассоциации бета-цепи CD18 с 4 отличительными альфа-цепями CD11. Интегрин CD11b/CD18 (αMβ2) также называется Mac-1. Интегрин CD11b/CD18 имеет широкие возможности связывания лигандов. Он может распознавать CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, компонент комплемента iC3b, фибриноген и LPS/LBP (комплекс липосахарида (LPS) и белок, связывающий LPS) среди других лигандов (7). Кроме того, существуют признаки внутримембранного взаимодействия CD11b/CD18 с такими связанными с GPI поверхностными молекулами, как CD16 или CD14 (8). Эти взаимодействия могут обеспечивать трансмембранные сигналы и функции эффектора связанных с GPI рецепторов мембраны. CD11b/CD18 сильно выражается на NK-лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах и макрофагах.

Моноклональное антитело BEAR1 (6) было отнесено к CD11b во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: A015, секция адгезивных молекул) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD11b-FITC +	12	38,49	0,76	1,98
Моноциты + CD11b-FITC	12	98,46	0,44	0,44
Гранулоциты + CD11b-FITC	12	98,56	0,16	0,16

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((granulocytes)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD11b-FITC	Y = 1,0214 X - 1,0220	0,9988

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (9).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (10).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-PE

REF IM1451 100 tests; 2 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD20, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A09142.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09142.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD20-PE+	50	7,37	3,17	43,0

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD20-PE +	12	9,97	0,29	2,91

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAJI)) и клетки отрицательной линии ((red blood cells)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD20-PE	Y = 1,0003 X +1,3484	0,9993

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD79b
Клон	CB3-1
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Affinity purified Ig associated molecules
Иммуноглобулин	IgG1 kappa
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD79b-PE

REF IM1612 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD79b, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии CD79b с помощью проточной цитометрии используется при характеристике В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (1).

Также этот маркер применяется при дифференциальной диагностике В-клеточных неоплазий для исключения миелоидных и Т-клеточных опухолей. Кроме того, CD79a используется для диагностики пре-В острого лимфобластного лейкоза (пре-В-ОЛЛ), так как многие из этих опухолей негативны по другим В-клеточным маркерам (2).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD79b-PE+	20	11,28	2,60	23,08

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD79b является частью дисульфидносвязанного гетеродимера, нековалентно прикрепленная к поверхности иммуноглобулинов для формирования рецепторов B-клеток. (BCR) (3).

Молекулярный вес CD79b приблизительно от 33 до 40 kDa при восстановленных условиях (3).

Экспрессия CD79b имеет место на ранних стадиях B-клеточного онтогенеза, ограничена B-лимфоцитами, впервые появляясь на поверхности на стадии пре-B клеток и сохраняясь на протяжении всех стадий дифференцировки B-клеток вплоть до плазматических клеток (4). CD79b играет важную роль в регуляции функции антигенных рецепторов так же как субъединицы CD3 с TCR на T-лимфоцитах (4).

CD79b был присвоен моноклональным антителам CB3-1 на 6-м совещании по антигенам дифференцировки человека в городе Кобе (Япония) в 1996 году. (W.S. Code: CD79.1, Section B) (3).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Моноциты + CD79b-PE	12	11,75	0,38	3,26

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((DAUDI)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD79b-PE	Y = 0,9664 X +3,2971	0,9977

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (5).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (6).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	HLA-DR
Клон	Immu357
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	EBV-transformed cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-HLA-DR-PE

REF IM1639 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген HLA-DR, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула HLA-DR представляет собой полезный индикатор для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании в рамках расширенной панели иммунофенотипирования. Анализ экспрессии антигена HLA-DR позволяет определить бластные клетки миелоидного происхождения. Их часто наблюдаемый фенотип: HLA-DR+ CD7– CD45 слабый. Однако гипергранулярные лейкозы промиелоцитарного типа (подгруппа LAM-M3) характеризуются слабой экспрессией индикатора HLA-DR или ее полным отсутствием (1).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
HLA-DR-PE+	50	30,12	10,95	36,37

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело Immu357 распознает эпитоп, который переносится на мономорфном белке в 29 – 33 kDa, идентифицируемый как HLA-DR. Система HLA (антиген лейкоцитов человека) – название главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Зашифрованные 5 локусами (DM, DO, DP, DQ и DR) локуса D молекулы HLA класса II также называют антигенами HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (2,3). Экспрессия антигенов класса II ограничена антиген-презентирующими клетками, то есть B-лимфоцитами, моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и клетками Лангерганса кожи (3,4). На тимоцитах антиген HLA-DR экспрессируется только после активации (5). Стволовые клетки и кроветворные клетки-предшественники экспрессируют его до определенной стадии своей дифференциации (3,6).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты HLA-DR-PE +	12	20,01	0,44	2,19

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((DAUDI)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
HLA-DR-PE	Y = 1,0074 X -1,2344	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (7).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (8).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD61
Клон	SZ21
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Washed human platelets
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 3,7 - 5,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD61-FITC

REF IM1758 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD61, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Комплекс CD61 / CD41 играет главную роль в регуляции адгезии и агрегации тромбоцитов в процессе гемостаза (1). Увеличение уровня экспрессии CD61 / CD41 на поверхности тромбоцитов при активации тромбоцитов можно отслеживать с помощью проточной цитометрии. Дополнительно к усилению экспрессии CD61 / CD41 претерпевает конформационные изменения, создающие сайты активного связывания фибриногена. Взаимодействие фибриногена с CD61 / CD41 индуцирует агрегацию тромбоцитов (2).

Анализ экспрессии CD61 используется для характеристики сосудистых патологий. Некоторые нарушения свертываемости крови могут быть объяснены качественными или количественными отклонениями экспрессии CD61. Дефект экспрессии CD61 вызывает тромбастению Гланцмана, которая характеризуется потерей или уменьшением агрегационного потенциала тромбоцитов (3).

Анализ экспрессии CD61 методом проточной цитометрии также используется для определения тромбоцитарных микрочастиц, способных к адгезии и агрегации (4). Более того, поскольку эндотелиальные микрочастицы не экспрессируют CD61 (5), возможно специфическое выявление тромбоцитарных микрочастиц с помощью данных антител. Количество тромбоцитарных микрочастиц может увеличиваться при острых коронарных синдромах (6), иммунной тромбоцитопенической пурпуре (7), пластике сосудов (4). Наконец CD 61 применяется для фенотипирования мегакариоцитарных/мегакариобластных лейкозов (8).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Для исследований активации ex vivo венозная кровь должна собираться в пластиковые или силиконизированные стеклянные пробирки с ЭДТА.

В конкретном случае активации тромбоцитов не рекомендуется использовать ЭДТА или гепарин (9).

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реагент для гейтинга: IOTest CD41-PE (каталожный номер A07781).
- Мышь Изотипический контроль FITC: Реактив IOTest (Ref. A07795).
- Отмывочный буфер для исследований ex vivo (PBS: 0.01 M фосфат натрия; 0.145 M хлорид натрия; pH 7.2, бычий сывороточный альбумин 1 мг/мл.
- Отмывочный буфер для исследований после активации in vitro: Tyrode's buffer (138 мМ NaCl, 3,6 мМ KCl, 10 мМ NaHCO3, 0,4 мМ NaH2PO4, 10 мМ MgCl2, и 6 мМ глюкозы, доведенный до pH 7.3 фосфорной кислотой) (10).
- Для исследований активации in vitro: агонист(ы) тромбоцитов в растворе (например, 50 µM ADP, 100 µM TRAP-6).
- Водяная баня 37°C.
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Для исследования тромбоцитов, экспрессирующих CD61, может быть использована цельная кровь, обогащенная тромбоцитами плазма (PRP), или отмытые тромбоциты. Методика для цельной крови, описанная ниже сочетает возможность анализа реактивности тромбоцитов с возможностью исследования активации тромбоцитов in vitro (3).

ПРИМЕЧАНИЕ:Для каждого анализируемого образца дополнительно к тестовой пробирке необходима контрольная пробирка, в которой клетки смешиваются с изотипическим контролем IgG1-FITC (Ref. A07795).

1. Оставьте PBS-BSA и растворы агонистов при 37°C
2. Используйте PBS-BSA хранимые при 4°C.
3. Разбавьте образец крове немедленно после получения PBS-BSA буфером при 37°C до концентрации 20.000 тромбоцитов/мкл.
4. Исследование ex vivo:

Поместите в каждую пробирку 40 мкл разведенного образца, 20 мкл CD41-PE (каталожный номер. A07781) и 20 мкл CD61-FITC (каталожный номер. IM1758). Учтите пробирку с изтипическим контролем IgG1-FITC (каталожный номер. A07795).

Осторожно перемешайте и инкубируйте 5 минут при 37°C в защищенном от света месте.

Остановите реакцию (смотрите шаг 6).

5. Активация In vitro:

Поместите 72 мкл разведенного образца в каждую пробирку.

Добавьте 8 мкл раствора агониста.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Осторожно встряхните и инкубируйте 10 минут при 37°C.

Добавьте 20 мкл CD41-PE (каталожный номер. A07781) и 10 мкл CD61-FITC (каталожный номер. IM1758). Учтите пробирку с изотипическим контролем IgG1-FITC (каталожный номер A07795).

Осторожно перемешайте и инкубируйте 5 минут при 37°C в защищенном от света месте.

6. Остановите реакцию добавлением 2 мл PBS-BSA буфера при 4°C.
7. Выполните сбор данных в течение 2 часов, с учетом следующих рекомендаций:

Установите логарифмическое усиление, низкую скорость потока; запись как минимум 5.000 событий, определите интерисующую область включая CD41-позитивные события (FL2 против FS), исключая дебрис (SS против FS), постройте гистограмму количество событий против FL2 (все тромбоциты) и количество событий против FL1 (активированные тромбоциты), оцените среднюю интенсивность флуоресценции.

ПРИМЕЧАНИЕ: анализ препарата необходимо выполнить в течение 24 часов.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 15 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD61-FITC+	15	99,8	0,25	0,3

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD61 (тромбоцитарный гликопротеин GPIIIa) – бета3 субъединица интегрина, весом 110 kDa, экспрессирующаяся главным образом на тромбоцитах и эндотелиальных клетках.

На тромбоцитах нековалентно связана с альфаIIb цепью интегрина (CD41, тромбоцитарный GPIIb) с формированием GPIIb/IIIa комплекса (альфаIIb/beta3 интегрин) или высокоафинного рецептора к фибриногену (11).

Независимо от CD41 CD61 также ассоциируется с интегрином альфаV (CD51) с образованием рецептора витронектина (12,13).

CD41/CD61 экспрессируется только тромбоцитами и мегакариоцитами, тогда как CD51/CD61 найден на остеобластах. Эндотелиальных клетках, макрофагах, фибробластах, smooth muscle клетках, синовиальной подложки и клетках и почечных клубочков (14).

CD61 несет систему тромбоцитарного аллоантигена HPA-1 (HPA-1a или PIA1; HPA-1b or PIA2). Различные исследования показывают, что 70% людей позитивны по PIA1/PIA1, 27%, PIA1/PIA2, and 3%, PIA2/PIA2 (15,16).

С использованием проточной цитометрии показано значительное снижение реактивности с PIA2 тромбоцитами, что позволяеет использовать для дифференцирования PIA1 от PIA2 (17,18).

Моноклональные антитела SZ21, специфические к CD61, распознают последовательность Cys26-Cys38 интегрина бета3 (19).

CD61 был присвоен моноклональным антителам SZ21 на 5-м совещании по дифференцировочным лейкоцитам человека (HLDA Workshop) в Бостоне, США в 1993 году (WS Code: P088) (20).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD61-FITC +	12	90,50	0,89	0,98

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (плазма, обогащенная тромбоцитами – PRP) и клетки отрицательной линии (красные клетки крови) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD61-FITC	Y = 0,9976 X +0,6846	0,9989

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. 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.
4. Во избежание высокового фонового сигнала (шума) не проводите фиксацию клеток в присутствии несвязанных антител.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Длительное хранение, центрифугирование, условия забора венозной крови, отличные от описаных в инструкции увеличивают неспецифическую активацию тромбоцитов.
6. В контексте исследования функции и активации тромбоцитов, преаналитическая процедура может оказать значительное влияние на результаты и увеличить искусственным образом активацию тромбоцитов (21,22) . Например, даже если SZ21 распознает экспрессию антигена CD61 на пробах возрастом до 24 часов, в литературе рекомендуется выполнить анализ пробы в течение нескольких часов (22).
7. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (23).
8. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (24).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD11c
Клон	BU15
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Dendritic cells from synovial fluid
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD11c-PE

REF IM1760 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD11c, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии CD11c используется для идентификации и характеристики гематологических нарушений (1,2,3,4), а также для диагностики волосатоклеточных лейкозов, некоторых В-клеточных лейкозов и определенных видов неходжкинских лимфом (2,4).

CD 11c применяется для фенотипирования циркулирующих в крови дендритных клеток, что было продемонстрировано для пациентов с миелоидным лейкозом (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c-PE+	50	19,57	6,73	34

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c-PE+	50	96,44	2,56	3

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD11c-PE+	50	99,13	0,66	1

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD11c (альфаX субъединица/лейкоцитарный поверхностный антиген p150) представитель семейства интегринов. Как и другие лейкоцитарные интегрины (CD11a, CD11b, CD11d), CD11c нековалентно связан с интегрином субъединицей бета2 (CD18) (6,7).

CD11c экспрессируется главным образом на моноцитах, макрофагах, естественных киллерах, в большей степени на гранулоцитах, дендритных клетках, некоторых субпопуляциях Т- и В-клеток (8,9).

CD11c присвоен моноклональным антителам BU15 (6) на 3-м совещании по антигенам дифференцировки человека, состоявшемся в 1986 в Оксфорде, (WS Code 256 Section M) (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD11c-PE +	12	28,66	1,07	3,74
Моноциты + CD11c-PE	12	99,90	0,11	0,11
Гранулоциты + CD11c-PE	12	94,02	0,29	0,30

Линейность

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD11c-PE	Y = 1,0046 X + 0,1733	0,9968

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD22
Клон	SJ10.1H11
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Human NALM1 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 -1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD22-PE

REF IM1835 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD22, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD22 выявляется в цитоплазме рано в онтогенезе B-клетки (поздняя pro-B стадия), появляется на поверхности клетки одновременно с экспрессией мембранного IgD и обнаруживается на большинстве зрелых B-лимфоцитов (1,2). Антиген CD22 исчезает на конечных стадиях дифференциации до стадии плазматических клеток (1). В периферической цельной крови экспрессия антигена CD22 ограничена B-лимфоцитами. Антиген CD22 полезен при фенотипировании большинства лейкозов B-клеток и почти всех лимфом B-клеток в сочетании с другими маркерами (3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD22-PE+	20	11,20	2,75	24,55

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD22 представляет собой одноцепочечную трансмембранную молекулу типа I с молекулярным весом в 130 – 140 kDa, состоящую из семи иммуноглобулино-подобных (Ig-подобных) областей (1). Поскольку эти области, входящие в суперсемейство иммуноглобулинов (IgSF), демонстрируют свойства белков, связывающих сиаловую кислоту, CD22 входит в семейство сиалоадгезинов, как и CD33 и связанный с миелином гликопротеин (MAG) (4). N-терминальная область, дистальная по отношению к мембране, представляет собой Ig-область V-типа, в то время как другие шесть областей, проксимальные по отношению к мембране, представляют собой Ig-области C2-типа (4). Цитоплазматическая область CD22 включает шесть тирозинов, представляющих собой возможные цели для фосфорилирования. Некоторые области внутрицитоплазматического хвоста представляют гомологию мотивов активации на основе тирозина (ITAM), некоторые другие – с мотивами ингибиции на основе тирозина (ITIM) (4,5). CD22 оказывается последовательно связанным с BCR (рецептор антигена B-клетки), и это может включать распознавание CD22 детерминант углеводов mIgM (6,7,8). CD22 является посредником при адгезии взаимодействия B-B лимфоцитов, а также B-клеток и взаимодействия эритроцитов и лейкоцитов (4,7,9,10).

Моноклональное антитело SJ10.1H11 было отнесено к кластеру дифференциации CD22 на втором Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Бостоне (1984) (11).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD22-PE +	12	9,07	0,75	8,23

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((DAUDI)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD22-PE	Y = 1,0032 X + 0,7976	0,9994

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 4,0 - 5,0
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-FITC

REF IM1870 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD34, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от BM-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

В целом, CD34 рассматривается как поверхностный антиген, подходящий для селекции субпопуляций клеток-предшественников из более крупных клеточных популяций, в том числе клеток мезенхимы, и не связанный только с гематопоэтическими и эндотелиальными клетками (13). Клетки CD34+ из многих типов ткани могут представлять собой источник клеток-предшественников, которые могут использоваться клинически в регенеративных медицинских стратегиях (14, 15).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реактив IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD34-FITC+	10	0,12	0,07	59,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (16).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD34-FITC +	12	53,10	0,59	1,10

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((KG-1a)) и клетки отрицательной линии ((RPMI8866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD34-FITC	Y = 1,0053 X + 0,2077	0,9997

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Myeloperoxidase
Клон	CLB-MPO-1
Гибридома	SP2/0 x CAF
Иммуноген	Очищенная миелопероксидаза
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 3,5 - 5
λ возбуждения	488 nM
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	Фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH 7,2, содержащий бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл и 0,1% NaN_3

Anti-Myeloperoxidase-FITC

REF IM1874 20 мкл / тест, 100 tests; 2 мл

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген Myeloperoxidase, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Миелопероксидаза (MPO) — распространенный гемсодержащий белок, важный компонент азурофильных гранул зрелых гранулоцитов и моноцитов. Специфическая экспрессия MPO в нормальных и лейкемических гранулоцитах привела к его рутинному использованию в качестве специфического миелоидного маркера при диагностике и классификации острых лейкозов. MPO играет важную роль в различении острого миелобластного лейкоза (AML) и острого лимфобластного лейкоза (ALL) (1,2,3,4).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Следует с осторожностью обращаться с растворами антител, содержащими натрия азид (NaN_3). Не принимайте внутрь и избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами. Кроме того, в кислой среде натрия азид может образовывать потенциально опасную азотистоводородную кислоту. Если требуется утилизация, рекомендуется разводить реагент в большом объеме воды, прежде чем выливать его в канализацию, чтобы избежать накопления натрия азида в металлических трубах и исключить возможность взрыва.
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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Реагент для Фиксации/Пермабилизации (каталожный номер: A07802 или A07803).
  - Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Мышь Изотипический контроль FITC: Реактив IOTest (Ref. A12689).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ Intraprep

Для пробоподготовки рекомендуется использовать реагент “IntraPrep Fixation/Permeabilization reagent” (каталожный номер: A07802 или A07803).

Для образца крови оптимальное окрашивание достигается при концентрации лейкоцитов 3 - 10 x 10^3 кл/мкл. Если концентрация клеток выше 10 x 10^3 кл/мкл, то разведите образец. При работе с клеточной суспензией оптимальное окрашивание достигается при концентрации 5 x 10^3 кл/мкл, разведите образец если необходимо.

1. Добавьте 50 мкл крови, отобранной с ЭДТА или 5 x 10^5 клеток в 2 пробирки (одна тестовая и одна контрольная).
2. Добавьте в каждую пробирку 100 мкл реагента 1 (Fixation) набора IntraPrep.
3. Тщательно перемешайте пробирки на вортексе (3-5 секунд).
4. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
6. Отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Удалите супернатант просредством аспирации.
7. Добавьте 100 мкл реагента 2 (Permeabilization) набора IntraPrep. Дайте смешаться путем диффузии. ВОРТЕКС НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ.
8. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре без встряхивания.
9. Осторожно встряхните пробирки вручную в течение 2-3 секунд.
10. Добавьте 20 мкл специфических конъюгированных антител IOTest в каждую тестовую пробирку и 20 мкл соответствующего изотипического контроля в каждую контрольную пробирку. Осторожно перемешайте пробирки.
11. Инкубируйте 15-20 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
12. Добавьте 4 мл буфера (PBS) и отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре.
13. Удалите супернатант посредством аспирации и ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5-1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution с рабочей концентрацией (1X) (каталожный номер: A07800).
14. Препараты готовы для цитометрического анализа

    ПРИМЕЧАНИЕ. Если препараты будут храниться перед цитометрическим анализом, рекомендуется хранить их при температуре 2–8°C, защищая от света. Однако даже при соблюдении данных условий препараты разрешается хранить не более 24 ч.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Моноциты	Номер	Среднее %	Станд. откл. (SD)	CV %
Myeloperoxidase$^+$	10	90,45	6,97	7,70

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гранулоциты	Номер	Среднее %	Станд. откл. (SD)	CV %
Myeloperoxidase+	10	99,82	0,24	0,24

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Миелопероксидаза (MPO) – внутриклеточный энзиматический белок, экспрессирующийся на ранних стадиях дифференцировки миелоидной клеточной линии.

Две субъединицы (а и í) имеют молекулярный вес 55 и 15 kDa, соответственно (5,6).

MPO синтезируется преимущественно на стадии формирования промиелоцитов, в течение которой образуются азурофильные (первичные) гранулы (6,7,8). MPO является основной составляющей азурофильных гранул полиморфноядерных нейтрофилов и макрофагов, но не экспрессируется ни лимфоцитами ни эритроцитами (6,8,9).

Моноклональные антитела CLB-MPO-1 распознает как MPO так и предшественник MPO (proMPO; неактивная форма фермента).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Mean (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Моноциты Myeloperoxidase+	12	96,89	0,41	0,42
Гранулоциты Myeloperoxidase+	12	99,96	0,03	0,03

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (пермабилизированные гранулоциты нормальной цельной крови) и клетки отрицательной линии (FRN17.4.14.33) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
Myeloperoxidase	Y = 0,9845 X +1,052	0,9992

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. 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.
4. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
5. 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 (11).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD79a
Клон	HM47
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Синтетический пептид (аминокислота 202-216) белка МБ-1 содержащих цитоплазматические
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Фикоэритрин (PE)
концентрация	PE / Ig: 0.5 - 1.5
λ возбуждения	488 nM
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	Фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH 7,2, содержащий бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл и 0,1% NaN_3

CD79a-PE

REF IM2221 100 тестов; 2 мл
20 мкл/тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD79a, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Маркер CD79a используется для диагностики В-клеточных злокачественных заболеваний поскольку позволяет дифференцировать их от миелоидных и Т-клеточных неоплазий. Кроме того, CD79a используется для диагностики пре-В острого лимфобластного лейкоза (пре-В-ОЛЛ) так как многие из этих опухолей негативны по другим В-клеточным маркерам (1).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Следует с осторожностью обращаться с растворами антител, содержащими натрия азид (NaN_3). Не принимайте внутрь и избегайте любого контакта с кожей, слизистыми оболочками и глазами. Кроме того, в кислой среде натрия азид может образовывать потенциально опасную азотистоводородную кислоту. Если требуется утилизация, рекомендуется разводить реагент в большом объеме воды, прежде чем выливать его в канализацию, чтобы избежать накопления натрия азида в металлических трубах и исключить возможность взрыва.
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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реагент для лизиса эритроцитов/пермеабилизации с этапом промывки после лизиса.

  Например : IntraPrep Fixation / Permeabilization реагент (каталожный номер A07802 or A07803).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Мышь Изотипический контроль PE: Реактив IOTest (Ref. A07796).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ Intraprep

Для пробоподготовки рекомендуется использовать реагент “IntraPrep Fixation/Permeabilization reagent” (каталожный номер: A07802 или A07803).

Для образца крови оптимальное окрашивание достигается при концентрации лейкоцитов 3 - 10 x 10^3 кл/мкл. Если концентрация клеток выше 10 x 10^3 кл/мкл, то разведите образец. При работе с клеточной суспензией оптимальное окрашивание достигается при концентрации 5 x 10^3 кл/мкл, разведите образец если необходимо.

1. Добавьте 50 мкл крови, отобранной с ЭДТА или 5 x 10^5 клеток в 2 пробирки (одна тестовая и одна контрольная).
2. Добавьте в каждую пробирку 100 мкл реагента 1 (Fixation) набора IntraPrep.
3. Тщательно перемешайте пробирки на вортексе (3-5 секунд).
4. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
6. Отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Удалите супернатант просредством аспирации.
7. Добавьте 100 мкл реагента 2 (Permeabilization) набора IntraPrep. Дайте смешаться путем диффузии. ВОРТЕКС НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ.
8. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре без встряхивания.
9. Осторожно встряхните пробирки вручную в течение 2-3 секунд.
10. Добавьте 20 мкл специфических конъюгированных антител IOTest в каждую тестовую пробирку и 20 мкл соответствующего изотипического контроля в каждую контрольную пробирку. Осторожно перемешайте пробирки.
11. Инкубируйте 15-20 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
12. Добавьте 4 мл буфера (PBS) и отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре.
13. Удалите супернатант посредством аспирации и ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5-1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution с рабочей концентрацией (1X) (каталожный номер: A07800).
14. Препараты готовы для цитометрического анализа

    ПРИМЕЧАНИЕ. Если препараты будут храниться перед цитометрическим анализом, рекомендуется хранить их при температуре 2–8°C, защищая от света. Однако даже при соблюдении данных условий препараты разрешается хранить не более 24 ч.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD79a +	50	11,92	5,26	44,2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD79a является частью дисульфидносвязанного гетеродимера CD79a/CD79b, нековалентно прикрепленная к поверхности иммуноглобулинов для формирования рецепторов B-клеток. (BCR) (1). Экспрессия CD79b имеет место на ранних стадиях B-клеточного онтогенеза, и таким образом цитоплазматическую локализацию на стадии pro B. Позже CD79a формирует часть BCR. Мембранная экспрессия сохраняется вплоть до плазмоцитоидной стадии, на которой локализация вновь становится цитоплазматической (2).

Моноклональные антитела HM47 реагируют с внутрицитоплазматическим эпитопом молекулы CD79a (2). CD79a был присвоен им на 5-м совещании по антигенам дифференцировки человека, состоявшемся в 1993 году в Бостоне, США (WS Code: cB017, Section B) (2).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD79a $^{+}$	12	16,82	0,49	2,89

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (RAMOS) и клетки отрицательной линии (MOLT16) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
CD79a	Y = 1.0058 X -1.3718	0,9991

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
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 (4).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD3
Клон	UCHT1
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	T cell line + IL2
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD3-APC

REF IM2467 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD3, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD3 — это трансмембранный белок, включающий полипептидные цепочки четырех типов: CD3γ, CD3δ, CD3ε и CD3ζ. CD3 связан с Т-клеточным рецептором (TCR), вместе они образуют комплекс TCR, отвечающий за выработку, активацию Т-клеток, а также за их эффекторные функции (1). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один хранимый мотив, который называется иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ), необходимый для выполнения сигнализирующей функции белка TCR (2, 3).

CD3 экспрессирует в цитоплазме про-Т-лимфоцитов, а затем в медуллярных типоцитах, когда антиген CD3 начинает мигрировать в мембрану клетки (4). Мембрана CD3 экспрессирует во всех зрелых Т-клетках и NK-Т-клетках. Фенотипический анализ CD3 можно провести путем распознавания доменов с мембраной на поверхности или внутриклеточного хвоста. CD3 является селективным маркером Т-линии дифференцировки и его экспрессия сохраняется в большинстве Т-клеточных новообразований (5, 6).

Поэтому CD3 входит в подавляющее большинство панелей проточных цитометров для диагностики Т-клеточных гематологических лимфопролиферативных заболеваний, в том числе лейкемию и лимфому (5, 6, 7). Иммунофенотипический анализ клеток CD3+, проводимый совместно с другими фенотипами клеток, позволяет получить готовую характеристику различных функциональных поднаборов Т-клеток, например клеток памяти, эффекторных и регуляторных Т-клеток (8).

Относительные и абсолютные значения CD3+ используются для оценки иммунокомпетентности определенного состояния иммунодефицита (например, ВИЧ, после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток), а также эффективности лечения, но при этом редко применяются при принятии решения о лечении (9, 10). CD3 также используется для диагностики и мониторинга активности Т-клеток у пациентов с первичным или вторичным иммунодефицитом, аутоиммунитета, а также оценки реакции на иммуноподавляющую терапию с лечением моноклональными антителами Т-клеток и антитимоцитарным глобулином (11, 12, 13, 14, 15, 16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD3-APC+	50	72,7	7,18	10

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Т-лимфоциты лежат в основе большинства периферийных лимфоцитов крови (PBL) (17). Т-лимфоциты характеризуются по наличию антигена CD3 (17, 18). Антиген CD3 представляет собой комплекс 5 полипептидных цепочек: γ, δ, ε, ζ и η связан с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) (19).

Цепочки CD3 объединяются в группу двух инвариантных димеров, γ/ε и δ/ε, связанных с переменным димером, который состоит из ζ гомодимеров или ζ/η, или гетеродимерами ζ/γ FcR (где гомодимер γFcR является цепочкой γ Fc-рецепторов) или гомодимеров γFcR (19, 20, 21). Комплекс CD3, связанный с TCR, участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II во время иммунной реакции (22).

Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов (23).

Моноклональное антитело UCHT1 вступает в реакцию с цепочкой ε комплекса CD3 (24). Это было отнесено к кластеру дифференцирования CD3 на 1-м международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Париже, Франция, в 1982 г. (25).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD3-APC +	12	41,27	0,64	1,55

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD3-APC	Y = 0,99 X + 1,23	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (26).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (27).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD4
Клон	13B8.2
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD4-APC

REF IM2468 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD4, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот реагент обеспечивает описание клеточных популяций лимфоцитов CD4+ при заболеваниях иммунной системы: СПИД (1) и другие состояния иммунодефицита, аутоиммунные заболевания (2), реакции гиперчувствительности, вирусные инфекции, восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа. Последующее наблюдение и фенотипирование клеточных популяций CD4+ (3) при злокачественных дискразиях крови, таких как лейкемии и лимфомы.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА С РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-APC+	50	55,91	10,82	19,3

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD4-APC+	50	90,86	4,97	5,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело (мАт) 13B8.2 распознает эпитоп, который находится в составе Ig-подобной области V1 антигена CD4. Исследование карты эпитопов с помощью мутаций во внецитоплазматических областях молекулы показало, что фиксация мАт 13B8.2 нарушается только в тех случаях, когда мутации включают остатки 88 и/или 89 (4). МАт 13B8.2 подавляет фиксацию ВИЧ-1 in vitro. Специфичность мАт 13B8.2 в отношении CD4 была установлена III Рабочим совещанием Общества по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (HLDA) в г. Оксфорде, Великобритания, в 1986 г. (код WS: 501, раздел: T) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD4-APC+	12	37,77	0,60	1,58

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((U937)) и клетки отрицательной линии ((RAJI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD4-APC	Y = 1,01 X - 0,17	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD8
Клон	B9.11
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human cytotoxic T-lymphocytes clone (HLA A2)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD8-APC

REF IM2469 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD8, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Т-клетки CD8+ традиционно классифицируются как Т-лимфоциты Т-клеток/цитотоксические Т-клетки. Анализ популяции лимфоцитов CD8+ с помощью проточной цитометрии является очень эффективным компонентом при определении ранее не исследованных различных функциональных поднаборов памяти, цитотоксических препаратов и функциональных поднаборов эффекторов. Таким образом, оценка CD8 является очень полезной для оценки компетентности Т-клеток и изменяется под воздействием множества факторов иммунодефицита, аутоиммунных состояний и неоплазии, в частности лейкемии, вызываемой Т-клетками, и лимфом.

Кратковременное распространение популяции Т-клеток CD8+ Т обычно происходит на раннем этапе заражения ВИЧ. Считается, что эти популяции роста клеток CD8+ способны содействовать нецитотоксичному подавлению репликации ВИЧ. Постоянное распространение этой популяции наблюдается при двух связанных условиях: синдром диффузного инфильтративного лимфоцитоза (СДИЛ) и связанный с ВИЧ синдром лимфоцитоза CD8+ (1,2). CD8 является маркером Т-клеток, который часто проявляется вместе с CD4 и распознается в большинстве Т-клеточных злокачественных опухолях, например при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и анапластической крупноклеточной лимфоме (3).

Т-клеточный лейкоз взрослых достаточно часто присутствуют в организме не проходящих лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающим фенотипом CD4+. С другой стороны наблюдалось резкое увеличение самопроизвольного распространения опухоли, что преобладает с лимфоцитами CD8+ у пациентов NHIH. Таким образом, размножение клона HTLV-1 положительных лимфоцитов CD8+ и CD4+ происходит с использованием двух разных механизмов. Поэтому инфекция HTLV-1 устанавливает предлейкозный фенотип, который ограничен инфицированными CD4+ клонами (4).

Т-клетки CD8+ Т участвуют в инициации, распространении и регулировании нескольких патогенных аутоиммунных реакций. Аутореактивные Т-клетки CD8+ также могут обеспечивать аутоиммунитет, секретируя цитокины, способные повышать восприимчивость целевых клеток к цитотоксичности, или секретируя хемокины, привлекающие другие иммунные клетки в область аутоиммунитета. Кроме того, было выявлено, что аутореактивные Т-клетки CD8+ уменьшают аутоиммунные реакции. Т-клетки CD8+ участвуют в патогенезе не менее чем 30 аутоиммунных нозологических единиц в основном за счет цитотоксического воздействия на различные целевые клетки (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD8+	50	35,9	9,4	26,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD8 является димером с дисульфидной связью, который существует либо в виде гомодимера CD8α, либо в виде гетеродимера CD8αβ. CD8β необходим для поверхностной экспрессии CD8α. Молекулярный вес каждого мономера α и β составляет примерно 32–34 kDa (6, 7). CD8 связывается с неполиморфным доменом (α3-доменом) молекул MHC класса I (8). Молекула CD8 присутствует в поднаборе Т-клеток лимфоцитов периферийной крови человека. Поднабор NK-клеток экспрессирует антиген CD8, но с малой и средней плотностью экспрессии (9).

Гомодимер CD8α экспрессируется NK-клетками и Т-клетками γδ+. CD8 также присутствует в большинстве тимоцитов, где он часто коэкспрессирует с CD4, а также в субпопуляции костномозговых клеток. Молекула CD8 взаимодействует с рецептором Т-клетки (TCR) в качестве корецептора для антигенраспознающей клетки, ограниченной MHC класса I (10, 11). CD8 широко используется как маркер цитотоксических Т-лимфоцитов.

Моноклональные антитела B9.11 взаимодействуют с α-субъединицей гетеродимера CD8 (12).

B9.11 mAb был отнесен к кластеру дифференцирования CD8 на первом International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека), который проводился в Paris, Франция, в 1982 г. (13, 14)

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD8-APC +	12	36,13	0,54	1,50

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HPBALL)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD8-APC	Y = 0,99X - 0,85	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY18 Lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-APC

REF IM2470 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (1). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим C-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов B-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов B-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых B-клеток.

Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения B-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(2). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для B-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев B-клеточных новообразований и моноклонального B-клеточного лимфоцитоза (3,4).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях B-клеток (5). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую B-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (6,7,8,9,10).

Обнаружение B-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (11,12). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (11). Многочисленные преимущества при лечении B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона B-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с B-клеточным острым лимфобластным лейкозом (B-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (13,14,15). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов B-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (16). Антиген CD19 наряду с другими B-/T-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка B-клеток, а также степени функционального восстановления B-клеток после пересадки костного мозга (17).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19-APC+	50	9,87	4,96	50,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (1). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов В-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов В-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых В-клеток.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD19-APC +	12	7,37	0,26	3,48

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19-APC	Y = 0,990 X + 1,244	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD33
Клон	D3HL60.251
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	HL60 human cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Affinity chromatography
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD33-APC

REF IM2471 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD33, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ антигена CD33 помогает в идентификации бластных клеток миелоидного происхождения (нормальных и злокачественных) и аберрантно экспрессируется популяциями B и T лимфобластной лейкемии/лимфомы (1, 2, 3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD33-APC+	10	91,71	4,92	5,4

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD33-APC+	10	99,52	0,47	0,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD33 является трансмембранным мономерным гликопротеином с молекулярным весом 67 кДа. Эта молекула относится к семейству сиалоадгезина: ее адгезивные свойства зависят от присутствия сиаловой кислоты (7). Молекула CD33 экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками из миеломоноцитарных и эритроидных линий клеток, но отсутствует в клетках лимфоидного происхождения (8). Она значительно экспрессируется на моноцитах и незначительно на циркулирующих гранулоцитах. Моноклональное антитело D3HL60.251 было отнесено к CD33 во время 4-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Вене, Австрия, в 1989 году (код WS: 504, секция M) (7).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Моноциты + CD33-APC	12	98,04	0,39	0,40
Гранулоциты + CD33-APC	12	100	0,00	0,00

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HEL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD33-APC	Y = 1,00 X +0,70	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD34
Клон	581
Гибридома	NS0 x balb/c
Иммуноген	Human CD34+ leukaemic cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD34-APC

REF IM2472 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD34, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD34 — трансмембранный белок, рассматривается как маркер клеток-предшественников для разнообразных тканей/систем, в том числе незрелые гематопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MSC), клетки эндотелия небольших сосудов (1, 2, 3). Белок клеточной поверхности CD34 широко использовался как маркер, способствующий идентификации и изоляции гематопоэтических стволовых клеток (HSC) из костного мозга, мобилизованной периферической крови, пуповинной крови и популяции клеток после экспансии/криоконсервации ex vivo. (4). В дополнение к оценке плюрипотенциала стволовых клеток CD34 используется в сочетании с другими маркерами (т. е. CD38, CD90) для оценки функциональных коммитированных клеток-предшественников, а позднее — лейкемических и других раковых стволовых клеток (5, 6, 7).

CD34 в настоящее время также признан как маркер нескольких других типов негематопоэтических клеток, в том числе предшественников эндотелия сосудов (8), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC), интерстициальных дендритных клеток и предшественников эпителия (1, 2, 3). Существуют многочисленные примеры потенциала дифференцировки CD34 как маркера различных негематопоэтических тканей; обычно в сочетании с другими маркерами. Однако, несмотря на использование CD34 как маркера стволовых клеток, его функция в этих системах остается неопределенной. CD34 признан как маркер клеток-предшественников эндотелия сосудов (9, 10, 11). Эти клетки, происходящие от BM-клеток, циркулируют в периферической крови, и их применимость в проангиогенной терапии широко изучается (11, 12).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD34-APC+	10	0,12	0,07	59,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

CD34 представляет собой мономерный, сильно гликированный трансмембранный белок I типа с молекулярным весом 116 КДа (2). Существует две молекулярные формы CD34; форма полной длины с последовательностью из 385 аминокислот имеет внутриклеточный домен, с консенсусом фосфорилирования киназы C, серина и треонина. Укороченная форма утратила большую часть этого внутриклеточного домена. Внеклеточная форма присутствует в обеих формах CD34. Для CD34 известны три типа эпитопов, на основании дифференциальной чувствительности к нейраминидазе и гликопротеазе. Эпитопы I класса (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) чувствительны ко всем протеолитическим ферментам. Эпитопы II класса (QBEnd10) резистентны к нейраминидазе, но чувствительны к гликопротеазе. Клон 581 распознает эпитоп классового типа III, нечувствителен ко всем протеолитическим ферментам и охотно связывается со всеми гликоформами CD34 (13).

5th HLDA workshop (5-й семинар по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека) (Boston, 1993 г.) утвердил три типа эпитопов CD34 на основе дифференциальной чувствительности.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD34-APC +	12	45,76	0,43	0,93

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((KG-1a)) и клетки отрицательной линии ((RPMI8866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD34-APC	Y = 1,00 X + 0,19	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (14).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (15).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-APC

REF IM2473 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-APC+	50	93,69	4,44	4,7

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-APC +	12	99,02	0,21	0,21

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((NAMALWA)) и клетки отрицательной линии ((FRN 3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45-APC	Y= 0,994 X - 0,1589	0,9996

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD56
Клон	N901 (NKH-1)
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Human chronic myeloid leukemia (hCML) cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD56-APC

REF IM2474 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD56, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Моноклональные антитела N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, который экспрессируется большинством натуральных киллеров (NK-клеток) периферической крови (1,2), а также субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3). NK-клетки характеризуются собственной и специфической цитотоксической активностью, которая проявляется, когда нарушается равновесие ингибирующих сигналов от иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (ИРК) и активирующих сигналов от рецепторов естественной цитотоксичности (РЕЦ). Таким образом, когда ИРК узнают достаточное число молекул HLA I на поверхности клетки-мишени, они подают в NK-клетки сигнал, способный ингибировать лизис. Напротив, если число таких молекул HLA недостаточно (случай опухолевых или инфицированных вирусом клеток), литический сигнал от РЕЦ не ингибируется, что приводит к лизису клетки-мишени (4).

У здоровых людей среди примерно 15% от общего числа лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих антиген NKH-1, более 95% клеток обладают как неспецифической, так и специфической цитотоксической активностью. Этот реагент позволяет характеризовать клеточные популяции или субпопуляции с NK и/или цитотоксической активностью, ассоциированной с фенотипом CD56+. Он также позволяет изучать эти популяции при заболеваниях иммунной системы: СПИД и другие иммунодефициты (2), аутоиммунные состояния, гиперчувствительность, вирусные инфекции и восстановление иммунного ответа после пересадки костного мозга и/или органа (5). Наконец, он может быть полезен при фенотипировании злокачественных дискразий крови, таких как лейкемии и лимфомы (6,7,8,9).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. IM2475.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. IM2475.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD56-APC+	20	22,2	10,4	47,0

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулярная масса сильно гликированного белка CD56 (молекулы NKH1) составляет 200–220 kDa (1,3). Он экспрессирует на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, которые демонстрируют не ограниченную главным комплексом гистосовместимости цитотоксичность (1,2). Моноклональное антитело N901 (NKH-1) вступает в реакцию с большинством NK-клеток (1,3). Оно также вступает в реакцию с небольшой популяцией CD3-положительных Т-клеток, которая опосредует пониженную цитотоксическую активность (2). Это антитело не вступает в реакцию с моноцитами, гранулоцитами, эритроцитами и В-лимфоцитами. Антитело N901 (NKH-1) было отнесено к кластеру дифференцирования CD56 на 4-м Международном семинаре, посвященном дифференцированию лейкоцитов человека, который проводился в Vienna, Австрия, в 1989 г. (10).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD56-APC +	12	20,29	0,63	3,09

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E)) и клетки отрицательной линии ((HUT78)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD56-APC	Y = 0,98 X + 1,53	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (11).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (12).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Not applicable
Клон	679.1Mc7
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Non biological Hapten
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
IgG1(mouse)-APC

REF IM2475 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный мышиный изотипический контроль Not applicable-APC , из серии реактивов IOTest может использоваться для анализа образцов крови человека с помощью проточной цитометрии. Он позволяет оценить долю неспецифического окрашивания лейкоцитов или тромбоцитов специфическими антителами изотипа Not applicable, конъюгированными с APC , из серии реактивов IOTest.

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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Стадии дифференцировки гемопоэтических клеток характеризуются наличием или отсутствием экспрессии поверхностных антигенов, которые можно идентифицировать с помощью моноклональных антител, имеющих четко определенную специфичность. Одной из трудностей, с которыми сталкиваются при анализе таких антигенов методами проточной цитометрии, является более или менее выраженная неспецифическая фиксация конъюгатов специфических моноклональных антител в процессе окрашивания. Чтобы оценить реальное значение этого положительного окрашивания, необходимо учесть вклад неспецифической фиксации в уровень измеряемого сигнала (1,2).

Данный изотипический контроль из серии IOTest служит для оценки уровня неспецифического окрашивания образца моноклональными антителами того же изотипа, конъюгированными с аллофикоцианином (APC) из серии IOTest.

При специфическом окрашивании границу между отрицательными и положительными событиями следует устанавливать для каждой исследуемой популяции в зависимости от сигнала, получаемого с изотипическим контролем.

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Специфические антитела, конъюгированные с APC , из серии реактивов IOTest.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 требуется одна контрольная пробирка. Данный изотипический контроль, -APC (Ref. IM2475) адаптирован для использования с APC -конъюгированными антителами серии IOTest.

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Моноклональное антитело 679.1Mc7, принадлежащее к подклассу изотипа IgG1, не связывается специфически ни с одним из дифференцировочных антигенов, присутствующих на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов человека.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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:

Отрицательно окрашенные клетки	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты IgG1 -	12	3,17	0,11	3,37
Моноциты IgG1 -	12	5,23	0,13	2,54
Гранулоциты IgG1 -	12	8,08	0,15	1,87

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (3).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (4).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD14
Клон	RMO52
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Isolated human monocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Allophycocyanin (APC)
концентрация	APC / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	633/638 nm
Пик эмиссии	660 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD14-APC

REF IM2580 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD14, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и умеренно – на нейтрофилах, подгруппе популяции дендритных клеток и макрофагах. CD14 – полезный индикатор для иммунофенотипирования острого миелоидного лейкоза (AML). Одновременный анализ экспрессии антигенов CD14 и CD13 помогает дифференцировать M4 AML (1) с моноцитарной онтогенностью (CD14+CD13+ фенотип) от M2 AML с немоноцитарной онтогенностью (CD14–CD13+ фенотип) (2; 3; 4; 5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль APC : Реактив IOTest (Ref. A12693.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A12693.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	10	93	5,70	6,10

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD14+	10	100	0,00	0,00

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD14 представляет собой белок молекулярным весом в 53 – 55 kDa, связанных в мембране с помощью группы гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (6). Антиген CD14 сильно экспрессируется на моноцитах и макрофагах и умеренно — на многоядерных нейтрофилах периферической крови; он также присутствует на плевральных фагоцитах и дендритных ретикулярных клетках. CD14 обнаруживается на клетках миеломоноцитарной линейки и очень слабо экспрессируется В-лимфоцитами. Он отсутствует в Т-лимфоцитах, а также в NK-клетках, эритроцитах и тромбоцитах (7).

Моноклональное антитело RMO52 было отнесено к CD14 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: MA62, секция M) (5).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Моноциты + CD14	12	99,89	0,00	0,06

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((activated THP1)) и клетки отрицательной линии ((FRN 3,4,14)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD14	Y = 0,99 X + 1,49	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (9).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD25
Клон	B1.49.9
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Alloactivated T lymphocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD25-PC5

REF IM2646 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD25, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Гетеротримерный рецептор IL2 (IL2RA, IL2RB и IL2RG) играет важную роль в поддержании работы иммунной системы (1,2). Для аналитической проточной цитометрии антиген CD25 играет критически важную роль в идентификации ряда фенотипических подмножеств, включая активированные Т-клетки, Т Reg-клетки, и дифференциальной диагностике лимфопролиферативных заболеваний и других функциональных субпопуляций (3).

Активированные Т-клетки можно отслеживать методом проточной цитометрии на основании поверхностных молекул, для которых обычно характерно повышающее регулирование, например CD25 (4). Действие иммуносупрессивных препаратов на активацию Т-клеток можно зарегистрировать непрямым анализом клеточной функции или прямым мониторингом активированных Т-клеток в цельной крови методом проточной цитометрии. Регуляторные Т-клетки (Treg-клетки), определяемые при экспрессии CD4(+) CD25(+), фактора транскрипции, FoxP3, выявляют супрессорную активность (5). IL2RA конституционно экспрессируется на регуляторных Т-клетках. Супрессорная активность Treg-клеток является как контактно-зависимой, так и цитокин-независимой. Treg-клетки играют центральную роль в поддержании аутотолерантности и гомеостаза ткани. Нарушение Treg сообщалось при ряде аутоиммунных состояний у человека. Истощение Treg-клеток приводит к возникновению множества аутоиммунных заболеваний (6,7).

Treg-клетки вносят важный вклад в развитие иммунной толерантности к опухолям и играют критическую роль в индукции толерантности к ассоциированным с опухолями антигенам и подавлении противоопухолевого иммунитета. Истощение Treg-клеток или блокирование их роли подавления иммунитета может усилить противоопухолевое действие. Недавние свидетельства предполагают, что Treg-клетки могут отвечать за сбой противоопухолевого иммунитета хозяина вследствие подавления цитотоксических Т-клеток (8,9). Естественным образом возникающие Treg-клетки поддерживают иммунологическую аутотолерантность и предотвращают ряд аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и системная красная волчанка. Treg-клетки использовались для лечения клинически аутоиммунного ревматоидного заболевания путем наращивания натуральных специфичных к аутоантигенам Treg-клеток ex vivo и последующего переноса обратно к хозяину. Во всех этих процедурах важную роль играют использование и обнаружение клеток CD25+ (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A09148.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09148.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD25-PC5+	50	10,88	5,12	47

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Обладающий высоким сродством рецептор IL-2 (IL-2R) представляет собой тримерный комплекс, состоящий из трех полипептидных цепей, α (IL-2Rα, Tac, p55 или CD25), β (IL-2Rβ, p75 или CD122) и γ (IL-2Rγ или p64). Т-лимфоциты экспрессируют рецептор IL-2, обладающий промежуточным сродством, который представляет собой комплекс β/γ или α/γ цепей. Цепи IL-2Rβ и IL-2Rγ принимают участие в опосредованном IL-2 клеточном сигнальном пути (11,12,13). Молекула CD25 (известная как Tac-антиген и рецептор интерлейкина-2 α IL-2Rα) в большом количестве экспрессируется на регуляторных CD4-положительных Т-лимфоцитах и не обнаруживается на покоящихся CD8-положительных лимфоцитах. Однако все активированные Т-лимфоциты экспрессируют белок CD25. Подмножество В-лимфоцитов (CD20-положительных) экспрессирует антиген CD25. Гранулоциты, моноциты, NK-клетки, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют CD25 (11).

Моноклональное антитело (mAb) B1.49.9 было отнесено к кластеру дифференцирования CD25 на 2nd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (2-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который проводился в Boston, США, в 1984 г. (код WS: T141, секция T) (14).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD25-PC5 +	12	21,18	1,69	7,96

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((FEV 20,3)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD25-PC5	Y = 1,0141 X + 0,3093	0,9989

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванно 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (15).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (16).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD33
Клон	D3HL60.251
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	HL60 human cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Affinity chromatography
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD33-PC5

REF IM2647 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD33, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ антигена CD33 помогает в идентификации бластных клеток миелоидного происхождения (нормальных и злокачественных) и аберрантно экспрессируется популяциями B и T лимфобластной лейкемии/лимфомы (1, 2, 3).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD33-PC5+	10	91,71	4,92	5,4

Granulocyte	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD33-PC5+	10	99,52	0,47	0,5

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD33 является трансмембранным мономерным гликопротеином с молекулярным весом 67 кДа. Эта молекула относится к семейству сиалоадгезина: ее адгезивные свойства зависят от присутствия сиаловой кислоты (7). Молекула CD33 экспрессируется гемопоэтическими клетками-предшественниками из миеломоноцитарных и эритроидных линий клеток, но отсутствует в клетках лимфоидного происхождения (8). Она значительно экспрессируется на моноцитах и незначительно на циркулирующих гранулоцитах. Моноклональное антитело D3HL60.251 было отнесено к CD33 во время 4-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Вене, Австрия, в 1989 году (код WS: 504, секция M) (7).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Monocytes +CD33-PC5	12	98,09	0,38	0,39
Granulocytes +CD33-PC5	12	100	0,00	0,00

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((HEL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD33-PC5	Y = 1,0064 X + 0,4804	0,9996

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD69
Клон	TP1.55.3
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Activated Human PBL
Иммуноглобулин	IgG2b
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD69-PC5

REF IM2656 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD69, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
CD69 – антиген очень ранней активации, экспрессия которого на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов быстро повышается при активации. По-видимому, CD69 вовлечен в патогенез некоторых воспалительных заболеваний, этот реагент может быть использован для характеристики и подсчета популяций, активированных CD69+ клеток при нарушениях иммунной системы: вирусных инфекциях (1), ревматоидном артрите (2), неблагоприятном исходе беременности и ЭКО (3), неатопической астме (4), дефектах пролиферации или активации лимфоцитов 5. С другой стороны CD69 позволяет наблюдать за функцией лимфоцитов после трансплантации органов (6) или специфической иммунотерапии (7).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль IgG2b(mouse)-PC5.
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD69-PC5+	10	27,45	15,61	56,87

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD69-PC5+	10	18,66	23,72	127,10

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD69-PC5+	10	22,91	20,21	88,24

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекула CD69 называемая также как молекула, индуцированная активацией (AIM) является дисульфидсвязанным гомодимером, состоящим из дифференцированно гликолизированных субъединиц.

CD69 является интегральным мембранным белком II типа с внеклеточным лектиновым доменом C-типа (8).

Это самый ранний гликопротеин, индуцируемый на поверхности клеток при активации T, B и NK клеток “in vitro”.

CD69 вовлечен в передачу сигнала на начальных этапах активации.

Большинство NK-клеток периферической крови негативно по CD69, но экспрессируют AIM вскоре после активации PMA, IL-2, интерфероном альфа, моноклональными антителами CD16 (9).

CD69 конститутивно экспрессируется на субпопуляциях тимоцитов и тромбоцитов (10). В NK клетках и тромбоцитах CD69 действует в качестве тригерной молекулы.

TP1.55.3 образует иммунопреципитат гомодимер в 60 kDa и обе субъединицы 27 kDa и 33 kDa (в восстановленных и невосстановленных условиях соответственно) из лимфоцитов периферической крови, активированных PMA и моноклональными антителами анти-CD3 (11).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD69-PC5 +	12	98,94	0,15	0,15

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((activated PBL)) и клетки отрицательной линии ((PBL)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD69-PC5	Y = 0,9873 X +0,3794	0,9994

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	TCR PAN γ/δ
Клон	IMMU510
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Soluble γ/ δ receptor
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
Anti-TCR
PAN γ/δ-PC5

REF IM2662 50 tests; 0,5 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген TCR PAN γ/δ, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
В отличие от Т-клеток, экспрессирующих альфа-бета (αβ) рецепторы, гамма-дельта (γ/δ) Т-клетки представляют небольшое подмножество (от 1,6 до 6,9%) CD3+ Т-клеток периферической крови (1, 2). В Т-клетках человека только два продукта δ генов, Vδ1 и Vδ2, часто используются γ/δ Т-клетками. TCR PAN гамма-дельта клон IMMU510 распознает цепи δ и три изоформы рецепторов γ/δ Т-клеток. Vδ1-и/или Vδ2-экспрессирующие Т-клетки можно легко определять и изучать проточной цитометрией. Изменения распределения различных подмножеств γ/δ Т-клеток наблюдались у некоторых пациентов с инфекцией ВИЧ (3).

Оценка проточной цитометрии пропорций репертуара TCRβ α/β Т-клеток и Т-клеток фенотипа TCRgd является чувствительным методом для оценки клональности Т-клеток (4). Молекулы антигенов, активирующие гамма-дельта Т-клетки, до сих пор преимущественно неизвестны. γ/δ Т-клетки специфичны тем, что им не требуется обработка антигеном и презентация эпитопов белка большого комплекса гистологической совместимости (MHC), хотя некоторые распознают молекулы MHC класса Ib (1, 2).

Исследования по описанию γ/δ Т-клеточных популяций методом проточной цитометрии, определили снижение с возрастом частоты γ/δ Т-клеток, но не α/β Т-клеток (5). В недавней работе было показано, что человеческие Vγ9/Vδ2 Т-клетки также способны к фагоцитозу, функции, ранее приписываемой исключительно незрелым клеткам миелоидного происхождения, таким как нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки (6).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 реактивом, описанным выше, было обработано 20 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
TCR PAN γ/δ-PC5+	20	5,77	3,81	66,03

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

TCR – это молекулярный комплекс, который содержит две единицы: распознающую, состоящую из альфа-бета или из гамма-дельта гетеродимеров, присутствующих на поверхности клеток взаимно исключающим образом, и трансдуцирующую единицу, комплекс CD3, общий для альфа-бета и гамма-дельта гетеродимеров, инициирующий Т-клетки, когда распознающая единица занимается антигеном. Распознающая единица распознает инородные антигены, и разнообразие, необходимое для этой функции распознавания, создается соматической рекомбинацией генов TCR (7, 8, 9).

Существуют четыре локуса гена TCR (альфа, бета, гамма и дельта). Каждый из них состоит из нескольких сегментов V (вариабельных), кодирующих приблизительно 90 аминокислот, очень коротких сегментов D (отвечающих за разнообразие) (только локусы α и дельта) и коротких сегментов J (связывающих) (около 15 аминокислот) и одного или двух сегментов C (постоянных) (10, 11). Большинство Т-клеток экспрессируют белок альфа/бета TCR (рецептор Т-клетки) и небольшая популяция Т-клеток экспрессирует гамма/дельта TCR, который обычно имеет дважды отрицательный (CD4/CD8) фенотип.

Гамма/дельта Т-клетки обычно являются первой линией защиты на эпидермальной и эпителиальной поверхностях и представляют 10–12% лимфоцитов в селезенке (12). IMMU 510 распознают все гамма/дельта Т-клетки вне зависимости от экспрессирующих вариабельных генов или связывающих регионов, что было показано иммунофлуоресцентными исследованиями с помощью проточной цитофлуориметрии как на поликлональных гамма/дельта Т-клеточных линиях, так и на гамма/дельта Т-клонах (13, 14, 15, 16, 17).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты TCR PAN γ/δ-PC5 +	12	5,95	0,21	3,52

Линейность

Аликвоты были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
TCR PAN γ/δ-PC5	Y = 1,0078 X -1,0002	0,9993

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD117
Клон	104D2D1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	MOLM-1 leukaemic cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin (PE)
концентрация	PE / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	575 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD117-PE

REF IM2732 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD117, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Поскольку его экспрессия происходит именно на ранней стадии гематопоэза, CD117 может быть индикатором острого лейкоза, особенно миелоидной линии (1-2). В небольшом числе случаев острого Т-лейкоза (T-ALL) сообщалось о положительной реакции на CD117, а экспрессия CD117 в случае В-клеток-предшественников-ALL встречается редко (1,3). Исследования показали, что CD117 может быть связан с мастоцитозом (3,4). Одновременный анализ антигенов CD34 и CD117 помогает в определении бластных клеток миелоидного происхождения: степень незрелости определяется экспрессией CD34, а миелоидное происхождение — коэкспрессия CD117 (1,3,5,6,2,4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль EDTA или цитрат-декстрозу, или гепарин).

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PE : Реактив IOTest (Ref. A07796.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07796.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD117-PE+	10	2,95	1,09	36,9

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD117, также известен как рецептор фактора стволовых клеток (SCFR), комплект тучных клеток и рецептор стального фактора, представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 145 kDa, зашифрованный набор протоонкогена (1). Молекула CD117 относится к семейству рецепторной тирозинкиназы класса III (RTK). В кроветворной системе молекула CD117 экспрессируется приблизительно на 50% клеток-предшественников CD34+, задействованных в эритроцитарной (7), миеломоноцитарной и мегакариоцитарной дифференциации (3,8). Хотя CD117 в первую очередь является индикатором нелимфоидных клеток-предшественников, сообщалось о его выявлении на ранних лимфоидных клетках-предшественниках (8,9). Экспрессия CD117 была выявлена на небольшой подгруппе покоящихся NK-клеток (яркий CD56) и приблизительно на 30% незрелых CD3– CD4– CD8– тимоцитов (3). CD117 также экспрессируется на тучных клетках (3,8) и выявляется на некроветворных клетках, например, в репродуктивной системе, меланоцитах и эмбриональных клетках мозга (8).

MAb 104D2D1 было отнесено к CD117 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: C-30. Секция C) (8).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD117-PE +	12	45,09	0,80	1,77

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E)) и клетки отрицательной линии ((RPMI8866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD117-PE	Y = 0,9914 X + 3,0081	0,9973

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD117
Клон	104D2D1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	MOLM-1 leukaemic cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD117-PC5

REF IM2733 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD117, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Поскольку его экспрессия происходит именно на ранней стадии гематопоэза, CD117 может быть индикатором острого лейкоза, особенно миелоидной линии (1-2). В небольшом числе случаев острого Т-лейкоза (T-ALL) сообщалось о положительной реакции на CD117, а экспрессия CD117 в случае В-клеток-предшественников-ALL встречается редко (1,3). Исследования показали, что CD117 может быть связан с мастоцитозом (3,4). Одновременный анализ антигенов CD34 и CD117 помогает в определении бластных клеток миелоидного происхождения: степень незрелости определяется экспрессией CD34, а миелоидное происхождение — коэкспрессия CD117 (1,3,5,6,2,4).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль EDTA или цитрат-декстрозу, или гепарин).

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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A07798.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A07798.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD117-PC5+	10	2,21	0,79	35,9

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD117, также известен как рецептор фактора стволовых клеток (SCFR), комплект тучных клеток и рецептор стального фактора, представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 145 kDa, зашифрованный набор протоонкогена (1). Молекула CD117 относится к семейству рецепторной тирозинкиназы класса III (RTK). В кроветворной системе молекула CD117 экспрессируется приблизительно на 50% клеток-предшественников CD34+, задействованных в эритроцитарной (7), миеломоноцитарной и мегакариоцитарной дифференциации (3,8). Хотя CD117 в первую очередь является индикатором нелимфоидных клеток-предшественников, сообщалось о его выявлении на ранних лимфоидных клетках-предшественниках (8,9). Экспрессия CD117 была выявлена на небольшой подгруппе покоящихся NK-клеток (яркий CD56) и приблизительно на 30% незрелых CD3– CD4– CD8– тимоцитов (3). CD117 также экспрессируется на тучных клетках (3,8) и выявляется на некроветворных клетках, например, в репродуктивной системе, меланоцитах и эмбриональных клетках мозга (8).

MAb 104D2D1 было отнесено к CD117 во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: C-30. Секция C) (8).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD117-PC5 +	12	37,87	0,57	1,49

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((MO7E)) и клетки отрицательной линии ((RPMI8866)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD117-PC5	Y = 0,9844 X +2,9521	0,9937

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (10).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (11).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	Anti-TdT (Pool)
Клон	HT1, HT4.HT8, HT9
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	TdT человека, бычий TdT
Иммуноглобулин	IgG1, IgG2A
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)
концентрация	FITC / Ig: Предоставляется по запросу
λ возбуждения	488 nM
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 6 мг / мл БСА и 0,1% NaN3

IOTest

Anti-TdT (Pool)-FITC

REF IM3524 50 определений; 1 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген TdT, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
TdT экспрессируют Т- и В-лимфоциты на ранних этапах развития в нормальном тимусе и костном мозге. Повышенные уровни TdT обнаружены в опухолях из незрелых лимфоидных клеток. Повышенная активность фермента характерна для большинства случаев острого лимфобластного лейкоза, но встречается с различной частотой и при миелолейкозе (1,2,3).

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

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

e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 20, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Для получения оптимальных результатов рекомендуется использовать следующие реагенты:
  - Реагент для Фиксации/Пермабилизации (каталожный номер: A07802 или A07803).
  - Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипические контроли: Реактивы IOTest

  IgG2a-FITC (Ref. A12689) и IgG1-FITC (Ref. A07795).
- Буфер (ФСБ: 0,01 M фосфат натрия; 0,145 M хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Для пробоподготовки рекомендуется использовать реагент “IntraPrep Fixation/Permeabilization reagent” (каталожный номер: A07802 или A07803).

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки смешивают с изотипическими контролями IgG2a-FITC (Ref. A12689) и IgG1-FITC (Ref. A07795).

Для образца крови оптимальное окрашивание достигается при концентрации лейкоцитов 3 - 10 x 10^3 кл/мкл. Если концентрация клеток выше 10 x 10^3 кл/мкл, то разведите образец. При работе с клеточной суспензией оптимальное окрашивание достигается при концентрации 5 x 10^3 кл/мкл, разведите образец если необходимо.

1. Добавьте 50 мкл крови, отобранной с ЭДТА или 5 x 10^5 клеток в 2 пробирки (одна тестовая и одна контрольная).
2. Добавьте в каждую пробирку 100 мкл реагента 1 (Fixation) набора IntraPrep.
3. Тщательно перемешайте пробирки на вортексе (3-5 секунд).
4. Инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
5. В каждую пробирку добавляют по 4 мл ФСБ.
6. Отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Удалите супернатант просредством аспирации.
7. Добавьте 100 мкл реагента 2 (Permeabilization) набора IntraPrep. Дайте смешаться путем диффузии. ВОРТЕКС НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ.
8. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре без встряхивания.
9. Осторожно встряхните пробирки вручную в течение 2-3 секунд.
10. В каждую тест-пробирку добавляют по 20 мкл специфического конъюгированного антитела IOTest, а в каждую контрольную пробирку – по 20 мкл соответствующего изотипического контроля. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
11. Инкубируйте 15-20 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
12. Добавьте 4 мл буфера (PBS) и отцентрифугируйте при 300 x g в течение 5 минут при комнатной температуре.
13. Удалите супернатант посредством аспирации и ресуспендируйте клеточный осадок в 0,5-1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution с рабочей концентрацией (1X) (каталожный номер: A07800).
14. Препараты готовы для цитометрического анализа

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ. Если препараты будут храниться перед цитометрическим анализом менее 24 ч., рекомендуется хранить их при температуре 2–8°C, защищая от света.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

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 реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Отрицательно окрашенные клетки	Номер	СИФ	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Anti-TdT (Pool)– лимфоцииты	10	0,25	0,02	9,25
Anti-TdT (Pool)– Моноциты	10	0,44	0,05	12,2
Anti-TdT (Pool)– Гранулоциты	10	0,50	0,13	26,6

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Терминальная деоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) является ядерным ферментом с молекулярной массой 58 кДа (4). Данная молекула катализирует случайное присоединение нуклеотидов по 3'-OH концам одноцепочечной ДНК. TdT отличается от прочих ДНК-полимераз тем, что не требует матрицы для полимеризации (4,5). TdT в основном экспрессируется клетками первичных и вторичных лимфоидных органов в ходе созревания иммунной системы, т.е. она экспрессируется предшественниками В-лимфоцитов в костном мозге и предшественниками Т-лимфоцитов в тимусе (4,6,7).

В нормальной периферической крови клетки, экспрессирующие TdT, никогда не обнаруживаются. Обнаружение TdT-положительных клеток в тканях вне костного мозга и тимуса является серьезным указанием на их вовлечение в лимфобластный лейкоз или лимфому. Клетки-предшественники миелоидного, эритроидного и мегакариоцитарного рядов, а также другие нелимфоидные клетки, в том числе мезенхимальные, эпителиальные и эмбриональные, не экспрессируют TdT (4).

Данный реактив представляет собой смесь 4 моноклональных антител (HT1, HT4, HT8 и HT9) против белка TdT.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений содержания положительно окрашенных клеток в образце, содержавшем положительно окрашенные клетки (смесь пермеабилизованных клеток положительной линии клеток MOLT4 и отрицательных контрольных клеток Cyto-Trol). Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	MFI	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Anti-TdT (Pool) +	12	75,40	2,48	3,29

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии (MOLT4, TdTpos) и клетки отрицательной линии (Cyto-Trol Control Cells (Ref. 6604248) TdTneg) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R^2)
Anti-TdT (Pool)	Y = 1,0114 X + 2,3079	0,9989

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Проточная цитометрия может дать ложные результаты, если цитометр идеально не юстирован, рассеивание флуоресценции правильно не скомпенсировано, а области тщательно не установлены.
2. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
3. Конъюгированное антитело в составе данного реактива откалиброванo 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.
4. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (8).
5. 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 (9).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD45
Клон	J33
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	Laz 221 cell line
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD45-PC7

REF IM3548 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Молекула CD45 и ее различные изоформы имеют различные степени экспрессии на лимфоидных (1, 2, 3) или миелоидных клетках (4). Эта экспрессия коррелирует со стадией дифференциации изучаемых клеток. Поэтому определение плотности экспрессии CD45 полезно для различения нормальных и злокачественных лейкоцитарных клеток (2, 4, 5, 6, 7). Экспрессия CD45 слабая в случае острого миелоидного лейкоза, что позволяет отличить злокачественные клетки от нормальных (8). Более того, степень экспрессии CD45 в случаях острого лимфобластного лейкоза может иметь прогностическое значение в отношении прогресса заболевания (2, 9). Наконец, моноклональные антитела CD45 (mAb) позволяют оценить возможное нелейкоцитарное загрязнение лимфоцитарного канала во время анализа графика ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние) по сравнению с флуоресценцией, излучаемой специфическими конъюгированными антителами CD45 (10).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС
Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ
Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ
Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ
Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР
- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 737662.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE
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 (Ref. 737662.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD45-PC7+	50	93,69	4,44	4,7

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Молекулы CD45 представляют собой одноцепочечные интегральные мембранные белки, состоящие как минимум из 5 изоформ от 180 до 220 kDa. Они образуются из-за альтернативных комбинаций сплайсинга трех экзонов (A, B и C) геномной последовательности. Неограниченный антиген CD45, общий лейкоцитарный антиген (LCA) состоит из внеклеточной последовательности, проксимальной по отношению к мембране, что является общей характеристикой всех изоформ CD45. Все моноклональные антитела, принадлежащие к кластеру CD45, вступают в реакцию с этой частью антигена и способны распознавать все изоформы CD45. Эти изоформы имеют экстрацитоплазматические последовательности от 391 до 552 аминокислот в длину с многочисленными сайтами присоединения N-связанных углеводов. Цитоплазмическая часть содержит две области фосфотирозина-фосфатазы. Неограниченный эпитоп CD45 присутствует на поверхности всех лейкоцитов человека; лимфоцитов, эозинофилов моноцитов, базофилов и нейтрофилов, в порядке уменьшения концентрации экспрессии. CD45 – значительный компонент мембраны лимфоцитов. Он отсутствует в эритроцитах и тромбоцитах. Он утрачивается во время созревания эритроидных клеток в костном мозге. Антитела CD45 вступают в реакцию с предшественниками лейкоцитов в костном мозге. Моноклональное антитело J33 связывается со всеми изоформами CD45, присутствующими на лейкоцитах человека.

Моноклональное антитело J33 было отнесено к кластеру дифференциации CD45 на 3-м Международном семинаре по дифференциальным антигенам человеческих лейкоцитов в Оксфорде, Великобритания (1986) (11). J33 был отнесен к кластеру CD45 на HLDA 3 под названием I.33 (антитело № 818).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD45-PC7 +	12	99,95	0,03	0,0

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((NAMALWA)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD45-PC7	Y = 1,004 X – 0,404	0,999

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Описываются случаи CD45-негативной или крайне слабо-положительной острой лимфобластной лейкемии. Поэтому лимфоцитарное происхождение бластных клеток требует подтверждения с помощью других маркеров (14,9).
8. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD7
Клон	8H8.1
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	Human thymocytes
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
концентрация	PC5 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	670 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD7-PC5

REF IM3613 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD7, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Анализ экспрессии антигена CD7 в качестве индикатора Т-линии в сочетании с экспрессией антигенов CD3 и CD5 полезен для диагностики пролиферативных синдромов Т-клеток, например, острых лимфобластных лейкозов (T-ALL) и пролимфоцитарных лейкозов Т-клеток (1,2,3,4). Их использование параллельно с другими миелоидными маркерами (миелопероксидаза и CD33), а также маркерами В-линии (CD79 и CD19) позволяет идентифицировать более 98% острых лейкозов (1). Антиген CD7 может экспрессироваться определенными острыми незрелыми миелоидными лейкозами (AML) (1). Использование методов измерения было предложено для классификации острых бифенотипических лейкозов (5). В этом контексте антиген CD7 считается скорее индикатором недифференцированной природы новообразования, а не маркером Т-линии (5).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC5 : Реактив IOTest (Ref. A09148.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A09148.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD7-PC5+	50	77,56	6,40	8

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Антиген CD7 является мономерным трансмембранным гликопротеином с молекулярным весом 40 кДа. Дистальная внеклеточная часть этого белка включает уникальный участок типа «вариабельной области иммуноглобулина».

Молекула CD7 экспрессируется рано в онтогенезе Т-клеток (внетимусная протимоцитная стадия) и сохраняется до стадии зрелых Т-клеток лимфоцитов (6,7,8). Антиген CD7 присутствует в тимоцитах, на большинстве циркулирующих Т-клеток лимфоцитов, на NK-клетках, на подгруппе популяции пре-В лимфоцитов, на В-клетках лимфоцитов, происходящих из эмбрионального костного мозга, а также на кроветворных плюрипотентных стволовых клетках (9,10). С другой стороны, зрелые В-клетки лимфоцитов и клетки эритроцитарного, миелоидного и мегакариоцитарного происхождения не экспрессируются CD7 (6,10). Моноклональное антитело 8H8.1 было отнесено к CD7 во время 2-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Бостоне, США, в 1984 году (код WS: 38, секция T) (11).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD7-PC5 +	12	87,73	0,38	0,43

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((CEM)) и клетки отрицательной линии ((DAUDI)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD7-PC5	Y = 0,9946 X -0,2241	0,9995

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (12).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (13).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC5 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC5 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC5 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD19
Клон	J3-119
Гибридома	NS1 x balb/c
Иммуноген	SKLY18 Lymphoma cells
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5 - 1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD19-PC7

REF IM3628 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD19, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD19 является одним из самых постоянным маркеров для определения В-лимфоцитов, который экспрессируется множеством клеток в В-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников В-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стадии дифференцировки и клеток плазмы(1). Антиген CD19 является трансмембранным гликопротеином, специфическим для В-клеточного пути, экспрессия которого обеспечивается в более чем 95% случаев В-клеточных новообразований и моноклонального В-клеточного лимфоцитоза (2,3).

Антиген CD19 отобран Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2006 году в качестве наиболее важного антигенного маркера фенотипа для определения селективности клеточной линии в пролиферациях В-клеток (4). По этой причине антиген CD19 включен в большинство проточных панелей для диагностики гематологических лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкемию, неходжкинскую В-клеточную лимфому и болезнь Рустицкого-Калера (5,6,7,8,9).

Обнаружение В-клеток с CD19 клональной природы при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) является типичным примером использование проточной цитометрии при диагностике и контроле заболевания (10,11). Более того, обнаружение CD19 вместе с другими маркерами и клеточными параметрами может быть полезным для определения устойчивой формы прогрессирующего хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (10). Многочисленные преимущества при лечении В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ) можно связать с селективностью при определении клона В-ОЛЛ на основе стабильной экспрессии антигена CD19.

Более того, антиген CD19 используется в качестве основного маркера при разработке панелей с антителами CD для контроля пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ) на минимальное остаточное заболевание (MRD) (ремиссия/рецидив и реакция на лечение, включая тестирование новых препаратов) (12,13,14). Антиген CD19 играет важную роль в выявлении дефектов В-клеток первичного и вторичного иммунодефицита (15). Антиген CD19 наряду с другими В-/Т-клеточными маркерами обеспечивает классификацию и клинический контроль с целью установления уровня недостатка В-клеток, а также степени функционального восстановления В-клеток после пересадки костного мозга (16).

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида 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.

10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. 6607099.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. 6607099.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

   0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

   0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD19-PC7+	50	9,87	4,96	50,2

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Клон J3-119 впервые был назначен для антигена CD19 во время семинара 4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4-й семинар по дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), который состоялся в Вене в 1989 г. (17). Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин 95 kDa, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антиген CD19 классифицируется как трансмембранный протеин типа I с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. Антиген CD19 используется клинически для установления собственных сигнальных порогов В-клеток за счет модуляции как зависимых, так и не зависимых от рецепторов сигналов В-клеток. Антиген CD19 функционирует в качестве доминантного сигнального компонента мультимолекулярного комплекса на поверхности зрелых В-клеток.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD19-PC7 +	12	6,81	0,31	4,59

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAMOS)) и клетки отрицательной линии ((FRN17,4,14,33)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD19-PC7	Y = 0,99 X + 0,61	0,99

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (18).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (19).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Спецификации
Специфичность	CD20
Клон	B9E9 (HRC20)
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
концентрация	PC7 / Ig: 0,5-1,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	770 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

IOTest
Conjugated Antibody
CD20-PC7

REF IM3629 100 определений; 1 мл, 10 мкл / test

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ
Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD20, 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 ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ
Антиген CD20 экспрессируется большинством клеток в B-лимфоцитном клеточном пути: от ранних предшественников B-клеток (клеток pro-B) до лимфобластов на последней стации дифференцировки и клеток плазмы (1). Молекула CD20, которая не экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, представляет собой трансмембранный белок, предположительно функционирующий как кальциевый канал и участвующий в активации и пролиферации B-клеток (2).

Молекула CD20 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопролиферативных синдромов при использовании на расширенной панели для иммунофенотипирования (3,4,5). Одновременный анализ антигенов CD20 и CD10 наряду с CD45 CD10, CD5, CD38, каппа- и лямбда-цепями обеспечивает простую идентификацию и определение характеристик подавляющего большинства случаев B-клеточной неоплазии. Другими полезными маркерами являются CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD и CD34, (3,4,5,6). Экспрессия CD20 в B-клетках используется для расчетных целевых моноклональных антител; терапии злокачественных B-клеточных новообразований (7).

Ритуксимаб и другие реагенты против CD20 в сочетании с химиотерапией обеспечивают эффективную ремиссию в ряде случаев лимфом, хронического лимфолейкоза (CLL) и других B-клеточных новообразований (8,9,10,11,12). Иммунотерапия против CD20 эффективно используется при аутоиммунных состояниях, включая ревматоидные артриты, системную красную волчанку (LSE) и тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) (13,14,15). Поэтому иммунологический контроль клеток, содержащих CD20, является полезным инструментом для диагностики и клинического ведения пациентов со злокачественными заболеваниями кроветворной системы и другими B-клеточными заболеваниями.

РЕАГЕНТЫ
Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN_3), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.

   Кроме того, в кислой среде из азида натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азида натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

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

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать 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 24часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реактив для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реактив для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль PC7 : Реактив IOTest (Ref. A12692.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

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 (Ref. A12692.).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
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. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C взащищенном от света месте.

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 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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD20-PC7+	50	7,37	3,17	43,0

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Во время семинара 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5-й семинар по дифференцировочному антигену лейкоцитов человека — HLDA), прошедшего в Бостоне, США, в 1993 году (код WS: CD20.12, раздел B) для CD20 был назначен клон B9E9 (HRC20) (16).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD20-PC7 +	12	11,43	0,24	2,1

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((RAJI)) и клетки отрицательной линии ((red blood cells)) 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 были окрашены в соответствии сописанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD20-PC7	Y = 1,0006 X +2,3313	0,9971

ОГРАНИЧЕНИЯ

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. 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 откалиброванo 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 гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (17).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (18).
7. Благодаря тандемной структуре флуорохрома PC7 также излучает свет при 575 нм. Этот вторичный пик излучения варьирует в зависимости от партии PC7 . Поэтому для многоцветного анализа матрицу компенсации необходимо тщательно проверить при изменении партии PC7 конъюгата.

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

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагенты Stem-Kit

REF IM3630 50 тестов

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

В набор реагентов Stem-Kit входят реагент с мышиным моноклональным антителом, меченым двухцветным флуоресцентным красителем (FITC, PE), контрольный мышиный изоклон, меченый двухцветным флуоресцентным красителем (FITC, PE), реагент абсолютного количества, реагент жизнеспособности и реагент для лизирования. Набор предназначен «Для in vitro диагностики» для одновременной идентификации и подсчета процентного содержания и абсолютных количеств популяций клеток CD45+ и двойственно-положительных клеток CD45+ CD34+ в биологических образцах методом проточной цитометрии. В число биологических образцов входят образцы свежей нормальной или мобилизованной периферийной цельной крови, и образцы свежих либо оттаянных продуктов афереза, пуповинной крови или костного мозга. Измерения популяций клеток можно производить либо автоматизированным методом сортировки и анализа, либо вручную.

См. вкладыш к набору реагентов Stem-Kit, чтобы получить полные инструкции по ручному анализу. Если вы используете автоматический метод, ознакомьтесь со stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP) с набором программного обеспечения stemCXP 2.0 и stemCXP версии 2.0, WIN 7, в которых приведены исчерпывающие инструкции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Гемопоэтические клетки-предшественники (HPC)

Реагенты Stem-Kit разработаны для идентификации человеческих гемопоэтических клеток-предшественников (HPC), причем для этой процедуры установлены следующие критерии: «истинные клетки CD34+ (a) экспрессируют антиген CD34, (b) экспрессируют антиген CD45 с характеристиками окраски, соответствующими бластным клеткам (то есть клетки легко распознаются, но на более низких уровнях, чем лимфоциты и моноциты), и (c) выявляют характеристики рассеяния бластных клеток с малым боковым углом и с передним углом, значение которого находится в диапазоне от малого до среднего» (1). Краситель 7-AAD, разработанный для выявления жизнеспособности, позволяет исключать мертвые CD34+ HPC из числа подсчитанных CD34+ HPC (2).

CD34

Антиген CD34 представляет собой семейство дифференциально гликозилированных трансмембранных одноцепочечных гликопротеинов I типа. (3, 4, 5). Он экспрессируется практическими всеми гемопоэтическими клетками-предшественниками, включая мультипотентные стволовые клетки. Эпитопы CD34 разделены на три класса в зависимости от чувствительности к нейраминидазе и к гликопротеазе Pasteurella haemolytica (6). Моноклональному антителу (mAb) CD34, вошедшему в комплект реагентов Stem-Kit, присвоено обозначение 581. Он специфическим образом распознает эпитопы III класса молекул CD34 (7), что определяется схемой ферментативного расщепления (6, 8). Моноклональное антитело 581 было признано специфичным в отношении антигена CD34 во время 5th HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (5-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека), проходившем в 1993 г. в Boston, Massachusetts, USA (США) (7).

CD45

Антитело CD45 распознает членов семейства CD45 пан-клеточных лейкоцитарных антигенов, молекулярный вес которых составляет 180, 190, 210 и 220 кДа (9, 10, 11). Он также известен, как общий лейкоцитарный антиген (LCA). Антиген CD45 экспрессируется на гемопоэтических клетках любого типа за исключением зрелых эритроцитов и их непосредственных предшественников (11, 12). В дифференцированных негемопоэтических тканях (12, 13, 14, 15) он обнаружен не был. Моноклональное антитело CD45 mAb, входящее в комплект реагентов Stem-Kit, носит обозначение J33. Оно было присвоено антигену CD45 во время 3rd HLDA Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (3-й семинар, посвященный дифференцирующим антигенам лейкоцитов человека) в Oxford, Англия, в 1986 году (16).

7-AAD

Краситель для определения жизнеспособности 7-амино-актиномицин D (7-AAD) является аналогом актиномицина D, содержащим замещенную аминогруппу в 7-й позиции хромофора. Краситель для определения жизнеспособности 7-AAD интеркалирует между цитозиновым и гуаниновым основаниями ДНК (15). Актиномицины являются биологически активными соединениями, содержащими хромофор 2-амино-4, 6 диметилфеноксазона-3 и два циклических пентапептида (17). Актиномицины образуют стабильные комплексы с двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), но ни с двухцепочечной рибонуклеиновой кислотой (РНК), ни с гибридами РНК-ДНК, ни с одноцепочечными РНК и ДНК они этих комплексов не образуют (15, 18).

Спектральные свойства красителя 7-AAD, разработанного для выявления жизнеспособности, делают эту молекулу особенно подходящей для анализа средствами проточной цитометрии (17). Максимальное значение абсорбции комплекса 7-AAD / ДНК достигается в зеленом регионе спектра, и таким образом, оно оказывается подходящим для цитометров, снабженным аргоновым лазером (длина волны возбуждения составляет 488 нм) (15). Ввиду испускания красителем 7-AAD, предназначенным для определения жизнеспособности (от 635 до 675 нм),

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

темно-красной флуоресценции, использовать эту пробу будет проще в сочетании с антителами, конъюгированными с флуоресцинизотиоцианатом (FITC) и с фикоэритрином (PE), потому что в отличие от пропидиум иодида (PI), комплекс 7-AAD / ДНК дает минимальное спектральное перекрытие с FITC и PE (17).

При анализе жизнеспособных клеток с помощью проточной цитометрии апоптотические, некротические клетки, а также поврежденные клетки являются источником интерференции. Нежизнеспособные клетки следует оценивать и выделять, прибегая к 7-AAD-позитивному окрашиванию, когда жизнеспособные клетки остаются неокрашенными (отрицательный признак) (19).

Системы проточных цитометров

В системах проточной цитометрии (FC 500) принципы проточной цитометрии применяются при анализе биологических образцов с тем, чтобы на основе используемых в ходе теста специфических моноклональных антител, поведение которых анализируется с помощью флуорохромов, идентифицировать различные клеточные популяции. Для анализа проб в ходе настоящего теста используются системы проточной цитометрии FC 500, снабженные программным обеспечением системы CXP.

ПРИНЦИП

Настоящий тест зависит от способности моноклональных антител связывать поверхность клеток, экспрессирующих дискретные антигенные детерминанты. Реагент CD45-FITC / CD34-PE из набора реагентов Stem-Kit является комбинацией двух мышиных моноклональных антител; каждое из них конъюгировано со специфическим флуорохромом и является специфичным для своего антигена на клеточной поверхности. К специфическому окрашиванию клеточной поверхности добавляется инкубация дублирующей пробы биологического образца с помощью двухцветного реагента CD45-FITC / CD34-PE.

В порядке дополнительного теста та же проба окрашивается реагентом CD45-FITC / IsoClonic Control-PE для определения реакции неспецифического связывания с моноклональными антителами к антигену CD34-PE. Краситель жизнеспособности 7-AAD, который является красителем нуклеиновой кислоты и связывает доступные пары оснований (клеточные ДНК), используется для того, чтобы отличать жизнеспособные клетки от нежизнеспособных. Эритроциты в каждой пробе подвергаются лизису с помощью лизирующего раствора NH4Cl, приготовленного в концентрации 1X. Добавляются флуоросферы Stem-Count или Flow-Count (реагенты для определения абсолютного количества), а оставшиеся клетки анализируются в проточном цитометре. Контроль процесса и контроль качества в ходе проведения испытания обеспечиваются специальными реагентами для контроля за инструментом и для контроля за качеством проб: флуоросферами Flow-Check, флуоросферами Flow-Set или подходящими компенсационными реагентами, а также Stem-Trol Control Cells.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Как показывает история, первые научные исследования, посвященные гемопоэтическим клеткам-предшественникам (HPC), основывались на подсчете ядросодержащих клеток с целью количественного определения. Последующие исследования, включавшие в себя анализ колониеобразующих единиц (КОЕ), давали грубое приближение популяций клеток-предшественников. На смену анализу КОЕ, сопряженному с большими временными затратами, пришло открытие молекул поверхности клеток CD34. Как выяснилось, CD34 присутствует на поверхности ранних гемопоэтических клеток, а также на поверхности колониеобразующих клеток в костном мозге и в периферической крови (20). Затем были выведены моноклональные антитела, направленные против молекул CD34; они нашли себе применение в проточной цитометрии. Определение CD34 средствами проточной цитометрии в настоящее время получило широкое признание в качестве метода количественного анализа гемопоэтических клеток-предшественников и стволовых клеток.

У обычного индивида от 1 до 3% клеток костного мозга, экспрессирующих антиген CD34, в состоянии восстановить долгосрочный мультилинейный гемопоэз (3, 20). В периферической крови обычного индивида антиген CD34 выделяется менее чем 0,1% циркулирующих клеток (1, 21). Использование реагентов Stem-Kit обеспечивает простой, быстрый и высокочувствительный метод цитометрии для подсчета гемопоэтических клеток-предшественников и стволовых клеток в периферической крови, продуктах лейкофереза, костном мозге и пуповинной крови.

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Реагенты Stem-Kit содержат следующее:

- Реагент CD45-FITC / CD34-PE (45/34) — 1 флакон.
- Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE (45/CTRL) — 1 флакон.
- Флуоросферы Stem-Count — 1 флакон.
- Краситель жизнеспособности 7-AAD — 1 флакон.
- Лизирующий раствор 10X NH_4Cl Lysing Solution — 2 флакона.

1. Эти реагенты следует использовать как единый комплект, именно так, как они выпускаются.

   При использовании специфических концентраций, установленных в целях исследования, для определения абсолютных количеств можно применять флуоросферы Flow-Count, эквивалентные флуоросферам Stem-Count.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. CD45-FITC / CD34-PE — это готовый к употреблению двухцветный реагент, поставляемый в натрий-фосфатном буферном растворе (PBS) объемом 2,2 мл с альбумином бычьей сыворотки (BSA) содержанием 2 мг/мл и 0,1%-ным азидом натрия в качестве консерванта.
3. CD45-FITC / IsoClonic Control-PE — это готовый к употреблению двухцветный реагент, поставляемый в натрий-фосфатном буферном растворе объемом 1,2 мл с альбумином бычьей сыворотки содержанием 2 мг/мл и 0,1%-ным азидом натрия в качестве консерванта. Реагент CD45-FITC / IsoClonic Control-PE представляет собой смесь неконъюгированных и конъюгированных фикоэритрином (идентичных CD34) моноклональных антител 581. Это смесь является подходящим средством изоморфологического контроля, позволяющим проверить наличие неспецифического связывания CD34-PE mAb в каждой пробе.

ЗАМЕЧАНИЕ: Реагенты CD45-FITC / CD34-PE и CD45-FITC / IsoClonic Control-PE разделять нельзя. При проведении тестов и контрольных измерений необходимо следить за тем, чтобы у обоих реагентов на этикетке флакона был один и тот же номер серии.

Сводка характеристик антител

Специфичность	**CD45**	**CD34**
Клон	J33	581
Гибридома	NS1 x Balb/c	NSO x Balb/c
Иммуноген	Human LAZ 221 ALL cell line	Human KG-1a cell line
Иммуноглобулин	Иммуноглобулин IgG1, легкие цепи к	Иммуноглобулин IgG1, легкие цепи к
Вид	Мышь	Мышь
Флуорохром	Флуоресцеина изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)
концентрация	5–8 молей FITC (флуоресцинизотиоцианата) на моль иммуноглобулина	0,5–1,5 моля PE (фикоэритрина) на моль Ig (иммуноглобулина)
λ возбуждения	488 нм (сине-зеленый)	488 нм (сине-зеленый)
Испускание флуоресценции	От 504 до 541 нм (преимущественно зеленый цвет)	От 568 до 590 нм (преимущественно оранжевый цвет)

4. Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count состоят из полистирольных флуоресцирующих микросфер диаметром 10 мкм (номинальный диаметр), погруженных в 20 мл водной суспензионной среды, содержащей сурфактант и 1% формальдегида. Каждая калибровочная частица содержит краситель с диапазоном флуоресценции от 525 нм до 700 нм при возбуждении волной на 488 нм. Оцениваемая концентрация флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count (число флуоросфер в 1 мкл) выводится по результатам многократных параллельных испытаний в анализаторе размеров частиц COULTER. Значение для каждой серии указано на этикетке флакона.
5. Краситель жизнеспособности 7-AAD выпускается в 99-процентном натрий-фосфатном буферном растворе (PBS: 0,01 M фосфат натрия, 0,145 M хлорид натрия, pH 7,2) с добавлением 1%-ного диметилсульфоксида (DMSO).
6. Лизирующий раствор NH_4Cl Lysing Solution выпускается во флаконах вместимостью 20 мл в десятикратной концентрации. Он содержит смесь хлорида аммония (NH_4Cl), бикарбоната калия ($KHCO_2$) и двунатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Препараты моноклональных антител содержат 0,1%-ный раствор азида натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. При сливании отходов в канализационную сеть следует открыть кран с водопроводной водой и дать протечь большому количеству воды во избежание взрывоопасных скоплений на трубах.
2. При работе с образцами и пробами, а также любыми контактирующими с ними материалами, следует выполнять правила и соблюдать меры предосторожности, установленные для потенциально инфицированных материалов.
3. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания проб или реагентов на кожу и слизистые оболочки.
4. Не используйте реагенты по истечении срока годности, указанного на этикетке флакона.
5. Флуросферы Stem-Count и Flow-Count содержат 1% формальдегида. Избегайте попадания формальдегида на кожу и в глаза, так как он может стать причиной необратимых повреждений этих тканей. Не вдыхайте пары. Используйте подходящие средства защиты, такие как перчатки и защита глаз.
6. Реагенты Stem-Kit нельзя подвергать воздействию яркого света или высоких температур ни во время хранения, ни при использовании.
7. Чтобы избежать получения ошибочных результатов измерения, не допускайте испарения и утечки флуоросфер Stem-Count и Flow-Count. После использования плотно закрывайте флаконы колпачками и храните их в вертикальном положении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Перед использованием убедитесь, что калибровочные частицы полностью возвращены в состояние суспензии. Избегайте избыточного перемешивания, чтобы свести к минимуму образование пузырьков воздуха. Во избежание получения ошибочных результатов не пипетируйте пузырьки воздуха.
9. Для дозировки проб, флуоросфер Stem-Count или Flow-Count используйте калиброванные пипетки (предпочтение следует отдавать пипеткам прямого вытеснения или капиллярам), это позволит избежать получения ошибочных результатов.
10. Во избежание получения ошибочных результатов и с целью правильного и точного отбора проб и флуоросфер Stem-Trol или флуоросфер Flow-Count, используйте техники пипетирования, рекомендованные производителем пипетки.
11. Во избежание получения ошибочных результатов окрашенные и лизированные пробы следует исследовать в проточном цитометре не позже чем через 1 час после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count.
12. Убедитесь в том, что произведен подсчет по крайней мере 1 000 флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count, в противном случае автоматической конверсии результатов в подсчет абсолютного количества не произойдет.
13. Для каждой партии флуоросфер Stem-Count или Flow-Count характерна специфическая концентрация флуоросфер. Убедитесь, что используется правильная аналитическая концентрация при определении результатов определения абсолютного количества клеток-мишеней.
14. Не следует использовать методы подготовки, требующие шага промывки, в связи с неизвестной потерей клеток.
15. Если время инкубации или смешивания или соответствующие температуры будут разниться с теми, которые указаны в инструкции, результаты могут оказаться неправильными.
16. Краситель жизнеспособности 7-AAD содержит 0,005% 7-AAD. Вещество 7-AAD в неразбавленном виде является потенциальным канцерогеном. Хотя это соединение и используется в сильно разведенном виде, мы рекомендуем избегать контакта с кожей и с глазами, использовать защитную одежду и перчатки и соответствующие средства защиты глаз и лица.
17. Краситель жизнеспособности 7-AAD содержит 1% диметилсульфоксида (DMSO). В чистом виде DMSO вызывает раздражение. Хотя это соединение и используется в разведенном виде, мы рекомендуем избегать контакта с кожей и с глазами, использовать защитную одежду и перчатки и соответствующие средства защиты глаз и лица.
18. Будучи хромофором, 7-AAD чувствителен к свету. Хранить краситель жизнеспособности 7-AAD нужно в картонной упаковке набора, что позволит избежать длительного воздействия света во время хранения.
19. Во время инкубации сведите к минимуму воздействие света на смешанные пробы.
20. При обращении с реагентами соблюдайте общие правила работы в лаборатории.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Флюоросферы Stem-Count — ОПАСНО!

H316	Вызывает незначительное раздражение кожи.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H350	Может вызвать рак.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P308+P313	ПРИ воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью.
P333+P313	При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Формальдегид 0,5 - 1,0% реакционная смесь из 5-хлоро-2-метил- 4-изотиазолин -3-он [EC № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин -3-он [EC № 220-239-6](3:1) < 0,05%
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	ОСТОРОЖНО!	
	H316	Вызывает незначительное раздражение кожи.
	P332+P313	При раздражении кожи: обратиться к врачу. Диметил сульфоксид 0,5 - 2%

SDS	Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Невскрытый реагент сохраняет свои свойства вплоть до истечения срока годности, указанного на флаконе, если его хранить при температуре 2–8°C в темном месте. Не используйте после истечения срока годности. Не замораживайте. Реагенты Stem-Kit сохраняют свои свойства в течение 30 дней после вскрытия флаконов с флуоросферами Stem-Count или Flow-Count. Вскрытые флаконы следует закрыть колпачком сразу же после использования и поместить на хранение в темное место с температурой 2–8°C. Флуоросферы Stem-Count или Flow-Count НЕЛЬЗЯ аликвотировать в посторонние флаконы; они должны храниться только в своих оригинальных флаконах.

ВАЖНО: В случае утечки флуоросфер Stem-Count или Flow-Count возникает риск получения ошибочных результатов. После вскрытия флуоросферы Stem-Count или Flow-Count необходимо хранить в вертикальном положении во избежание возможности утечек. Не следует использовать реагенты, если наблюдаются признаки утечки.

Признаки непригодности

К числу признаков порчи может быть отнесено следующее:

Реагенты Stem-Kit, за исключением флуоросфер Stem-Count

- Внешние изменения, см. ниже описание нормального внешнего вида для каждого вещества

Реагент	Нормальный внешний вид
CD45-FITC / CD34-PE	Прозрачная, слегка розовая жидкость
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE	Прозрачная или розоватая жидкость
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	Прозрачная жидкость, от розоватого до красноватого цвета
Лизирующий раствор NH_4CL Lysing Solution	Прозрачная бесцветная жидкость

Stem-Count Fluorospheres

- Обнаруживаемые во время сбора данных признаки наличия второй флуоресцирующей популяции, которая составляет более 20% от общей популяции флуоросфер.
- При подсчете количеств и проб наблюдаются большие вариации значений.

ВАЖНО: В случае появления признаков порчи реагентами пользоваться нельзя, поскольку возможны ошибки в результатах. При обнаружении признаков порчи обратитесь в местное представительство компании Beckman Coulter.

Подготовка реагентов

1. Двухцветные реагенты CD45-FITC / CD34-PE и CD45-FITC / IsoClonic Control-PE следует использовать непосредственно из флакона в неразведенном виде.
2. Флуоросферы Stem-Count и Flow-Count используются непосредственно из флаконов, без разведения. При первом вскрытии с верха флакона следует удалить весь алюминий термосвариваемого покрытия. Субстанции необходимо как следует перемешать. Впервые приступая к работе с флуоросферами Stem-Count или Flow-Count в начале дня, перемешайте их на вортексе в течение 3–5 секунд.

   Перед пипетированием из флакона осторожно встряхните жидкость, перевернув флакон 3–5 раз.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

После перемешивания на вортексе в начале дня восстановите значения температуры флакона, соответствующие 2–8°C; эта температура должна поддерживаться в течение всего времени, пока продукт не будет использован.

Во избежание испарения и утечек плотно закрывайте флакон колпачком после использования.

3. Краситель 7-AAD, разработанный для определения жизнеспособности, используется прямо из флакона без разведения.
4. Лизирующий раствор 1X NH_4Cl Lysing Solution необходимо готовить ежедневно: добавьте девять частей деионизированной воды к одной части лизирующего раствора NH_4Cl Lysing Solution, имеющего 10-кратную концентрацию. Не охлаждайте в холодильнике. В конце дня неиспользованный лизирующий раствор 1X NH_4Cl Lysing Solution утилизируют.

Прежде чем использовать какой-либо реагент, разогрейте его до комнатной температуры (18–25°C).

ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Требования к образцам

1. В число биологических образцов входят образцы свежей нормальной или мобилизованной периферийной цельной крови, и образцы свежих либо оттаянных продуктов афереза, пуповинной крови или костного мозга.
2. Гемопоэтические клетки-предшественники (HPC), подвергнутые манипуляциям или очищению, можно анализировать только в режиме ручной сортировки.
3. Для сбора продуктов афереза, проб периферической крови, образцов пуповинной крови или проб костного мозга используйте стерильную вакуумную пробирку с антикоагулянтом для сбора крови (ACD формула A, K3EDTA); эта мера обеспечит асептический режим. Перед процедурой окрашивания (которая должна быть произведена не позднее чем через 24 ч) антикоагулированные образцы следует хранить при комнатной температуре (18–25°C).
4. Прежде чем подготавливать пробу, убедитесь в том, что концентрация лейкоцитов (WBC) не превышает 30 x 10^9 лейкоцитов на литр. В случае необходимости разведите пробу с помощью HBSS (сбалансированный солевой раствор Хенкса) или аналогичного средства, для того, чтобы достичь концентрации 15 x 10^9 WBC на литр. Запишите коэффициент разведения для окончательного расчета абсолютного количества HPC.
5. Низкие концентрации белка могут приводить к комкованию флуоросфер Stem-Count или флуоросфер Flow-Count, результатом чего могут оказаться искусственно завышенные абсолютные количества клеток. Образцы с низким содержанием белка следует разводить буферным раствором, содержащим белок.
6. Все образцы следует обрабатывать реагентами Stem-Kit, включая краситель жизнеспособности 7-AAD.

Процедура пробоподготовки

Выполните испытания дважды, следуя инструкциям «The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry» (Директивы ISHAGE по определению клеток CD34+ с помощью проточной цитометрии) (1).

ЗАМЕЧАНИЕ: Для работы с контрольными клетками Stem-Trol в том случае, если выбран метод вручную, воспользуйтесь исчерпывающими инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковке к набору контрольных клеток Stem-Trol. Если вы используете автоматический метод, ознакомьтесь со stemONE System Guide (Руководство по системе stemONE) с программным обеспечением системы stemONE или stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP) с программным обеспечением системы stemCXP, в которых приведены исчерпывающие инструкции.

1. Для каждой пробы образца нанесите на пробирки следующие обозначения:

- 45/34/7-AAD #1
- 45/34/7-AAD #2
- 45/CTRL/7-AAD

2. Пипетируйте 20 мкл реагента CD45-FITC / CD34-PE в пробирки: 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2.
3. Пипетируйте 20 мкл реагента CD45-FITC / IsoClonic Control-PE в пробирку: 45/CTRL/7-AAD.
4. С помощью пипетки добавьте во все пробирки по 20 мкл красителя жизнеспособности 7-AAD.

ВАЖНО: Риск неполного лизиса, если образец крови остается в верхней части или на боковой стороне тестовой пробирки. Выполняйте пипетирование с осторожностью, чтобы избежать попадания крови на верхнюю или боковую часть тестовой пробирки. Очистите пробирку ватным шариком, если требуется, чтобы удалить все следы образца крови с верхней или боковой части тестовой пробирки.

5. Используя пипетку прямого вытеснения или репитер-пипетку, пипетируйте 100 мкл пробы пациента в пробирку.
6. ж) Немедленно перемешивают пробирку на вортексе в течение 5 с.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Все пробирки инкубируйте при комнатной температуре (18–25°C) в течение 20 минут, в защищенном от света месте.
8. После инкубации добавьте 2 мл приготовленного лизирующего раствора 1X NH4Cl Lysing Solution в каждую пробирку и незамедлительно обработайте на вортексе в течение 5 секунд.

ЗАМЕЧАНИЕ: Подробные сведения по приготовлению лизирующего раствора Lysing Solution приведены выше в разделе 7.2 «ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ».

ВАЖНО: Риск ошибочных результатов в случае пипетирования пузырьков воздуха. Излишнее перемешивание флуоросфер Stem-Count или Flow-Count может привести к созданию пузырьков воздуха. Не допускайте чрезмерного перемешивания флуоросфер Stem-Count или Flow-Count и не пипетируйте пузырьки воздуха в пробирки с пробой.

9. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 мин, в защищенном от света месте.
10. Осторожно перемешайте флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, переворачивая флакон 3–5 раз перед использованием.
11. Перед сбором данных, используя пипетку прямого вытеснения или репитер-пипетку, пипетируйте по 100 мкл флуоросфер Stem-Count или Flow-Count в каждую из трех пробирок.
12. Перемешайте на вортексе каждую пробирку в течение 5 секунд.

ЗАМЕЧАНИЕ: Подробные сведения по приготовлению лизирующего раствора Lysing Solution приведены выше в разделе 7.2 «ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ».

Краткая инструкция по окрашиванию образцов

Реагенты и пробы	45/34/7-AAD #1	Наименование тестовой пробирки 45/34/7-AAD #2	45/CTRL/7-AAD
CD45-FITC / CD34-PE	20 мкл	20 мкл	
CD45-FITC / IsoClonic Control-PE			20 мкл
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	20 мкл	20 мкл	20 мкл
Исследуемый материал	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 20 минут. Хранить в темном месте.			
1X NH_4Cl Lysing Solution	2 мл	2 мл	2 мл
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 минут. Хранить в темном месте.			
Stem-Count Fluorospheres	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Перемешать на вортексе — хранить на тающем льду перед сбором данных не более 1 часа. Оттаянные пробы следует немедленно анализировать. Хранить в темном месте.			

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азида натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».
Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азида натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

1. Деионизированная вода.
2. Сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) или его эквивалент
3. Stem-Trol Control Cells (Ref. IM3632).
4. Flow-Check Fluorospheres (Ref. 6605359)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007)
6. CYTO-COMP Cell Kit (Ref. 6607023)
7. QuickCOMP 2 Kit (Ref. 177018)
8. Альтернатива Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF. 7547053)
9. Ледяная ванна
10. Пластиковые тестовые пробирки (12 x 75 мм)
11. Калиброванная репитер-пипетка (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками или калиброванная пипетка прямого вытеснения (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками
12. Калиброванные стандартные пипетки (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) с наконечниками.
13. Мешалка типа Вортекс (вихревой смеситель).
14. Таймер.
15. Проточный цитометр.
16. Набор программного обеспечения stemCXP 2.0, stemCXP версия 2.0, WIN 7, ТОЛЬКО для автоматического анализа проб на системе проточного цитометра FC 500, оснащенной программным обеспечением CXP (версия 2.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Настройки протокола анализа

Проточный цитометр должен быть оборудован средствами детекции прямого светорассеяния, бокового светорассеяния и четырех каналов флуоресценции. Для канала FL3 (для мониторинга флуоросфер Stem-Count или Flow-Count) используйте полосовой фильтр диапазонов 620 нм. Для канала FL4 (для мониторинга красителя жизнеспособности 7-AAD) используйте длинноволновой фильтр 675 нм.

Убедитесь в том, то проточный цитометр корректно отрегулирован, а измерение интенсивности флуоресценции стандартизировано.

9.2.3 Убедитесь в корректности настроек компенсации флуоресценции.

ЗАМЕЧАНИЕ: При анализе образцов все положения областей до момента завершения сбора материала пробирки 45/34/7-AAD #1 определяются приблизительно. Области оптимизируются согласно следующему протоколу и затем, при работе со второй и третьей пробиркой серии, никаких корректировок не допускается.

Для анализа образца необходимо следовать серии из 8 гистограмм и схеме сортировки (см. ниже). Этой же серии из 8 гистограмм и этой же схеме сортировки нужно следовать при использовании контрольных клеток CD34+. Области A, B, C и D (определения областей см. под заголовком «Создание области») должны быть откорректированы так, чтобы они включали кластер характеристик контрольных клеток CD34+.

Построение гистограмм

Создайте гистограммы следующим образом:

1. Создайте гистограмму 1 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
2. Создайте гистограмму 2 как FL2 CD34-PE относительно бокового рассеяния.
3. Создайте гистограмму 3 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
4. Создайте гистограмму 4 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
5. Создайте гистограмму 5 как FL1 CD45-FITC относительно FL2 CD34-PE.
6. Создайте гистограмму 6 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
7. Создайте гистограмму 7 как время относительно флуоросфер FL3 Stem-Count или Flow-Count.
8. Создайте гистограмму 8 как краситель жизнеспособности FL4 7-AAD относительно бокового рассеяния.

Гистограммы 1–4 предназначены для описания CD34+ HPC, этот процесс можно отложить до этапа анализа. Эти первые четыре гистограммы настраиваются согласно ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Руководство ISHAGE по определению клеток CD34+ методом проточной цитометрии) (1,2). Гистограммы 5–7 предназначены для мониторинга параметров, которые имеют значение на этапе сбора. Сюда входит дискриминатор прямого светорассеяния, количество событий CD45+ для сбора и правильное накопление синглетов флуоросфер.

Гистограмма 8 предназначена для дифференциации жизнеспособных и нежизнеспособных событий и проведения анализа жизнеспособных событий.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Создание регионов

Создайте следующие регионы:

1. Гистограмма 1 — создайте на гистограмме 1 прямолинейный регион A, включающий все лейкоциты CD45+ и исключающий тромбоциты, остатки эритроцитов и какие-либо скопления.
2. Гистограмма 1 — создайте на гистограмме 1 аморфную область E, которая будет включать лимфоциты (яркие CD45, низкое боковое светорассеяние).
3. Гистограмма 2 — создайте прямолинейный регион B на гистограмме 2, включающий все события CD34+. Установите на гистограмме 2 предел подсчета, равный 75 000 событий (события CD45+).
4. Гистограмма 3 — создайте аморфный регион C на гистограмме 3, включающий все объединенные события CD45dim.
5. Гистограмма 4 — создайте аморфный регион D на гистограмме 4, включающий все объединенные события со средним боковым рассеянием и средним или высоким прямым рассеянием.
6. Гистограмма 5 — создайте квадрант-регион I на гистограмме 5 для проверки нижнего предела экспрессии CD45 на событиях $CD34^{+}$.
7. Гистограмма 5 — создайте аморфный регион H на гистограмме 5, чтобы окружить все флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, включая дублеты. Регион H должен быть расположен в верхнем правом углу гистограммы 5.

   ЗАМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что регион H обозначен как регион AMORPHOUS (Аморфный).

8. Гистограмма 5 — создайте на гистограмме 5 прямолинейную область K (назовите ее «listgate – ») Установите границы области K на первой декаде логарифмической шкалы гистограммы двух параметров. Эта область K позволяет исключать дублирование отрицательных событий во время сбора, что позволит проанализировать 75 000 релевантных событий CD45+.
9. Гистограмма 6 — копируйте регион D с гистограммы 4 как регион F на гистограмме 6.
10. Гистограмма 7 — создайте прямолинейную область G на гистограмме 7, включающую только синглеты флуоросфер Stem-Count или Flow-Count. Область G можно отметить как «CAL» (Калибровка), чтобы обеспечить автоматический подсчет абсолютного количества гемопоэтических клеток-предшественников CD34+ HPC (дополнительные сведения приведены в руководстве по инструменту).
11. Гистограмма 8 — на гистограмме 8 создайте прямолинейную область, которая бы включала жизнеспособные лейкоциты (отрицательные события красителя жизнеспособности 7-AAD).

Создание гейтов

Создайте области селекции следующим образом:

1. Гистограмма 1 — выполните назначение «J» гистограмме 1 для отображения всех жизнеспособных событий. Если 7-AAD не используется, назначьте гистограмме 1 область «-H» для отображения всех событий, за исключением всех флуоросфер Stem-Count или Flow-Count, в том числе дублетов.
2. Гистограмма 2 — поставьте гистограмме 2 в соответствие регион «AJ» (регион «A» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD34+.
3. Гистограмма 3 — поставьте гистограмме 3 в соответствие регионы «A», «B» и «J» (регионы «A» и «B» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD45+ / CD34+.
4. Гистограмма 4 — поставьте гистограмме 4 в соответствие области «A», «B», «C» и «J» (области «A», «B» и «C» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить все образующие кластеры жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) события CD45+ / CD34+ со слабым боковым светорассеянием, исключая при этом тромбоциты и посторонние частицы. События из региона ABCDJ являются действительными жизнеспособными гемопоэтическими клетками-предшественниками (HPC) CD34+.
5. Гистограмма 5 — без селектора для отображения всех событий.
6. Гистограмма 6 — поставьте гистограмме 6 в соответствие область «EJ» (область «E» в том случае, если не используется 7-AAD) для того, чтобы отобразить с помощью дискриминатора все жизнеспособные (или все имеющиеся, если не используется 7-AAD) лимфоциты в порядке визуальной проверки.
7. Гистограмма 7 — выполните назначение «H» гистограмме 7, чтобы отобразить все флуоросферы Stem-Count или Flow-Count, включая дублеты.
8. Гистограмма 8 — выполните назначение «A» гистограмме 8 для отображения событий CD45+.

Настройки проточной цитометрии

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно настроен и оптимизирован для светорассеяния, а интенсивность флюоресценции детекторов FL1, FL2, FL3 и FL4 соответствует директивам производителя и лаборатории.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Убедитесь, что настроена цветовая компенсация для стандартной работы. Дополнительные инструкции см. в руководстве по инструменту.

2. Обработайте тестовые пробирки на вортексе в течение 5 секунд.
3. Выполните сбор данных на проточном цитометре. Следует проанализировать не менее 75 000 событий CD45+.
4. Для анализа образцов: отрегулируйте дискриминатор и области, проанализировав содержимое пробирки с пробой 45/34/7-AAD #1. Сохраните протокол, и анализ пробирок 45/34/7-AAD #2 и 45/CTRL/7-AAD выполняйте уже без дальнейших корректировок.

Пример анализа

Гистограммы, содержащиеся в ПРИЛОЖЕНИИ, отображаются в порядке возрастания номеров, как показано в протоколе.

Расчет CD34+ HPC для образца

Число CD34+ HPC получают как среднюю величину статистических результатов области D для двух параллельных проб (то есть как 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2).

Результаты CD34+ HPC считаются действительными в том случае, если количество результатов, полученных с помощью реагента CD45-FITC / IsoClonic Control-PE, составляет менее 10% от результатов CD34+ HPC.

1. Рассчитайте среднее значение для результатов, полученных из пробирок 45/34/7-AAD #1 и 45/34/7-AAD #2, по каждому образцу (то есть, выполните усреднение распечатанных статистических результатов по области D). Число CD34+ HPC не должно превышать 10% от средней величины двух параллельных проб. Результаты считаются действительными, если значение, полученное по контрольной пробирке 45/CTRL/7-AAD, составляет менее 10% от среднего значения по исследуемым пробиркам

   ПРИМЕЧАНИЯ: Если среднее значение абсолютного количества CD34+ HPC, полученное по результатам параллельных испытаний, оказалось за пределами диапазона нормы (то есть превысило 10%), проверьте, правильно ли было произведено пипетирование; в особенности это касается флуоросфер Stem-Count и Flow-Count. Просмотрите отчеты проточной цитометрии и проверьте качество окрашивания и процессы лизирования в тестовых пробирках. Проверьте способ установки границ региона.

   Если значение, полученное при использовании 45/CTRL/7-AAD, оказывается за пределами допустимых значений (т. е. превышает 10% от средней величины абсолютного количества, полученной в двух параллельных испытаниях), проверьте, правильно ли было произведено пипетирование; в особенности это касается флуоросфер Stem-Count или Flow-Count. Просмотрите отчеты проточной цитометрии и проверьте качество окрашивания и процессы лизирования в тестовых пробирках. Проверьте способ установки границ региона.

   В случае необходимости повторите этап сбора данных, добавив пробирку BLANK (бланк) после первой дублирующей пробирки 45/34/7-AAD #1 и #2 и перед пробиркой 45/CTRL/7-AAD. В случае необходимости повторите цикл подготовки пробы с новыми тестовыми пробирками, добавив к ним пробирку BLANK (бланк). Выполните сбор и проанализируйте как новую, так и предыдущую серию пробирок. Сравните два результата. Если отсутствует соответствие, обратитесь в местное представительство компании Beckman Coulter.

2. Если проба была разведена, полученный результат ДОЛЖЕН быть умножен на коэффициент разведения (Dil). Окончательным полученным результатом будет абсолютное количество CD34+ HPC (клеток/мкл).

Абсолютное количество CD34+ HPC (клеток/мкл) = абсолютное количество CD34+ HPC согласно результатам распечатки (клеток/мкл) x коэффициент разведения

3. При анализе пакета продуктов афереза общее число CD34+ HPC пакета может быть рассчитано по следующей формуле:

Общее число CD34+ HPC (гемопоэтических клеток-предшественников) в пакете = Абсолютное количество CD34+ HPC (клеток/мкл) x 10^6 x объем пакета (л)

Где:

4. Для определения процентного содержания CD34+ HPC (гемопоэтических клеток-предшественников CD34+) при расчете значения лейкоцитов CD45+ воспользуйтесь следующей формулой:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

$$\% \text{ CD34+ HPC} = \frac{\text{Подсчет абсолютного количества CD34+ HPC (клеток/мкл) (то есть результаты распечатки области D)}}{\text{Подсчет абсолютного количества лейкоцитов CD45+ (клеток/мкл) (то есть результаты распечатки области A)}} \times 100$$

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Убедитесь, что проточный цитометр настроен корректно в соответствии с рекомендациями производителя, приведенными в руководстве по работе с инструментом. С целью оптимизации настроек светорассеяния и флюоресценции в инструменте для анализа проб, окрашенных реагентом моноклональных антител CD45-FITC / CD34-PE и реагентом CD45-FITC / Isoclonic Control-PE, были установлены целевые значения интенсивности.

Флуорохромы FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PE (фикоэритрин) и краситель 7-AAD (7-амино-актиномицин) при излучении имеют различные длины волн, однако они характеризуются некоторым спектральным перекрытием, которое должно быть скорректировано электронной компенсацией. Оптимальные уровни компенсации могут быть рассчитаны на двухпараметрической гистограмме путем анализа пробы крови с добавлением Stem-Trol Control Cells, окрашенных красителем жизнеспособности 7-AAD и подходящими компенсационными реагентами при использовании программного обеспечения CXP. В ходе этого анализа вносятся коррективы, дающие гарантию, что ни в одном квадранте дуальной окраски не произойдет окрашивания каким-либо индивидуальным флуорохромом.

Использование красителя 7-AAD (7-амино актиномицин D), разработанного для определения жизнеспособности, позволяет в ходе анализа с помощью проточной цитометрии выявить нежизнеспособные клетки с тем, чтобы произвести подсчет тех жизнеспособных клеток, которые представляют интерес для исследователя. Краситель впитывается мертвыми клетками (яркие события), что позволяет их впоследствии исключать из числа жизнеспособных клеток (негативные события) с помощью установки дискриминационного окна (см. гистограмму 8).

Перед анализом проб необходимо окрасить контроль для количественного определения (контрольные клетки Stem-Trol) с целью проверки реактивности антител.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Представленные производственные характеристики получены, исходя из использования реагентов Stem-Kit на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением System II. Примеры характеристик цитометра FC 500, работающего на программном обеспечении CXP, приведены в stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP).

Ожидаемые значения для диапазонов нормы

Для установления диапазона нормальных значений были собраны образцы нормальной цельной крови (n = 117) мужчин (n = 58) и женщин (n = 59). Это исследование было проведено в сторонней экспертной лаборатории. Для каждого образца были подготовлены параллельные испытания в соответствии с инструкциями на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit. Была произведена клеточная сортировка вручную и выполнен анализ для получения значений CD45+, CD34+ и CD34%.

Статистический анализ предполагает негауссово распределение собранных данных. На основании этих результатов для анализа данных был избран непараметрический (робастный) подход. Были получены показатели CD45+, CD34+ и CD34%. Результаты для CD45+ и CD34+ выражаются в абсолютных количествах (клеток/мкл), а для CD34% в процентах к общему количеству лейкоцитов, см. таблицу ниже.

Нормальная цельная кровь: диапазоны значений нормы

Ручной метод (проверка робастности)	n	CD45+ (клеток/мкл)				CD34+ (клеток/мкл)				CD34+ (%)			
		Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее	Станд. откл. (SD)	Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее	Станд. откл. (SD)	Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее	Станд. откл. (SD)
Ручной	117	2919.5	11240.0	6469.2	1635.2	0,50	6,50	2,36	1,14	0,015	0,600	0,052	0,056

Эти значения используются только в качестве примера. В каждой лаборатории должны быть установлены собственные диапазоны ожидаемых результатов с учетом проб нормальных доноров из числа местного населения.

Диапазон линейности

В каждом из 10 последовательных разведений для 2 типов проб — для периферической цельной крови с добавлением CD34+ и для свежей мобилизованной периферической крови — были произведены параллельные измерения. Для концентраций CD34+ HPC был достигнут динамический диапазон от 0 до 2 000 клеток/мкл и чувствительность для низких концентраций от 0 до 150 клеток/мкл. В соответствии с инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit, были приготовлены пробы, которые были затем проанализированы на проточном цитометре COULTER EPICS XL/XL-MCL. Значения выражены как абсолютные количества (клеток/мкл). Результаты были проанализированы методом линейной регрессии для сравнения ожидаемых и измеренных абсолютных количеств;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

расчеты были произведены для средних значений параллельных измерений за исключением эндогенных CD34+ клеток. См. следующие таблицы.

Углы наклона линий регрессии на графиках абсолютных количеств CD34+ HPC определяют математические критерии линейности. Линейность подтверждается также минимальной потенциальной систематической ошибкой, по полученным при анализе точкам пересечения графиков с осью y. Ожидаемые абсолютные количества демонстрируют хорошую корреляцию с полученными значениями этого параметра.

Результаты анализа цельной крови с добавлением определяемого антигена CD34+

График приведен в Приложении.

Результаты периферической крови (мобилизованные клетки)

График приведен в Приложении.

Точность метода (таблицы) (сравнение ожидаемых и полученных результатов)

Достоверность метода определяется как степень согласования между ожидаемыми и полученными результатами как для автоматизированного метода сортировки и анализа, так и для метода сортировки и анализа вручную. К свежей нормальной цельной периферической крови добавляли очищенные CD34+ клетки с доведением концентрации до 1 875 клеток/мкл. Подсчет клеток проверялся на гемоцитометре Малассе, после чего выполнялись последовательные разведения для получения растворов различных концентраций. Ожидаемые результаты сравнивали с полученными по средним значениям двух изменений, выполненных для каждого уровня разведения с помощью автоматической сортировки и анализа и сортировки и анализа вручную. Наклон линии и точка ее пересечения с осью ординат не выявляют статистически значимых различий между результатами сортировки и анализа и ожидаемыми результатами ни в случае ручного, ни в случае автоматического метода.

Точность метода — CD34+ (%)

График приведен в Приложении.

Точность метода — абсолютное количество CD34+ (клеток/мкл)

График приведен в Приложении.

Точность метода — общее количество лейкоцитов — CD45+ (клеток/мкл)

График приведен в Приложении.

Точность метода (сравнение результатов, полученных ручным и автоматическим методами)

В четырех сторонних экспертных лабораториях с использованием образцов свежей периферической цельной крови, свежего или оттаянного афереза, пуповинной крови и костного мозга была произведена сравнительная оценка точности автоматизированного и ручного методов системы stemONE. Был рассчитан 95% доверительный интервал (ДИ).

В соответствии с инструкциями, приведенными во вкладыше к упаковке реагентов Stem-Kit, в проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL были подготовлены и проанализированы образцы свежей периферической цельной крови (n = 59 из трех лабораторий), свежих продуктов афереза (n = 51 из трех лабораторий), свежей пуповинной крови (n = 29 из двух лабораторий), свежего костного мозга (n = 33 из двух лабораторий), оттаянных продуктов афереза (n = 23 из одной лаборатории), оттаянной пуповинной крови (n = 31 из двух лабораторий) и оттаянного костного мозга (n = 20 из одной лаборатории). Была произведена ручная клеточная сортировка и выполнен анализ для получения показателей CD45+, CD34+ и CD34%.

Точность методов (рисунки)

Образцы свежей периферической цельной крови (n = 59)

График приведен в Приложении.

Образцы свежих продуктов афереза (n = 51)

График приведен в Приложении.

Образцы свежей пуповинной крови (n = 29)

График приведен в Приложении.

Свежие образцы костного мозга (n = 33)

График приведен в Приложении.

Образцы оттаянных продуктов афереза (n = 23)

График приведен в Приложении.

Образцы оттаянной пуповинной крови (n = 31)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

График приведен в Приложении.

Оттаянные образцы костного мозга (n = 20)

График приведен в Приложении.

Воспроизводимость

Межлабораторная точность

Исследования проводились в пределах одного клинического учреждения тремя операторами, каждый из которых использовал отдельный проточный цитометр. Было идентифицировано три образца, представивших динамический диапазон CD34+ (0–2 000 клеток/мкл):

Нижний диапазон:	свежая, мобилизованная периферическая кровь
Средняя часть диапазона:	продукт афереза
Верхний диапазон:	продукт афереза

Эти образцы были разбиты на три аликвоты, каждый из трех операторов получил по одной аликвоте для каждого уровня (низкий, средний и высокий). В соответствии с инструкциями, приведенными на вкладыше в упаковку реагентов Stem-Kit из каждой аликвоты были приготовлены пробы (n = 10). Каждый оператор выполнял анализ на проточном цитометре EPICS XL, определяя методом ручной и автоматической сортировки и анализа содержание CD45+, CD34+ и процентное содержание CD34%. Полученные значения выражаются как в процентах (%) от общего числа лейкоцитов, так и в виде показателей абсолютного количества (клеток/мкл).

В нижеследующих таблицах представлены результаты исследования межлабораторной точности, где они сгруппированы по уровням. По результатам вычисления средних значений, стандартных отклонений и коэффициентов вариации при проведении параллельных испытаний абсолютные количества CD45+ и CD34+, а также процентное содержание CD34 продемонстрировали низкую вариабельность.
График приведен в Приложении.

Внутрилабораторное исследование точности

Из свежей периферической цельной крови, свежего костного мозга, а также свежих и оттаянных продуктов афереза и пуповинной крови, присланных из четырех сторонних экспертных лабораторий, был получен набор образцов, обеспечивший покрытие всего динамического диапазона исследования. В соответствии с инструкциями, содержащимися во вкладыше к упаковке реагентов Stem-Kit было приготовлено по десять проб каждого образца, которые затем были исследованы на проточных цитометрах COULTER EPICS XL/XL-MCL с применением ручного метода сортировки и анализа для измерения значений CD45+, CD34+ и CD34%.

Значения CD45+, CD34+ и CD34%, представленные в нижеследующих таблицах, показывают, что метод анализа является воспроизводимым, как это подтверждается средними значениями, стандартными отклонениями и коэффициентами вариации, полученными в ходе этих измерений. Таблицы данных, представленные в ПРИЛОЖЕНИИ, демонстрируют показатели внутрилабораторной точности для испытания.
График приведен в приложении.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Ознакомьтесь со stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP), прилагаемым к программному обеспечению системы stemCXP, для получения информации по ограничениям, которые нужно соблюдать при использовании автоматического метода.

- Во избежание получения ошибочных результатов окрашенные и лизированные пробы необходимо хранить на льду и исследовать в проточном цитометре не позже чем через 1 час после добавления флуоросфер Stem-Count или Flow-Count.
- Реактивы нельзя разводить, делить на аликвоты или замораживать. Использовать только в оригинальной упаковке.
- Реагенты предназначены только для использования при проведении проточной цитометрии.
- Для достижения оптимального окрашивания следует соблюдать правила оттаивания замороженных образцов.
- При следующих условиях может оказаться, что не все эритроциты будут лизированы: наличие ядерных форм эритроцитов, отклонения в концентрации белка, или гемоглобинопатия. При этом результаты подсчета CD34% могут оказаться искусственно заниженными, поскольку нелизированные эритроциты будут сосчитаны как лейкоциты. Это не должно сказаться на измерении абсолютных количеств CD34+ и CD45+.
- В случае некоторых пациентов могут возникать особые проблемы ввиду измененных или очень низких количеств клеточных популяций.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Результаты, полученные при проточной цитометрии, могут оказаться ошибочными, если дискриминационные окна были установлены неправильно.
- Реагенты Stem-Kit разработаны для того, чтобы с помощью красителя жизнеспособности 7-AAD определять жизнеспособные клетки HPC. Если в вашей лаборатории используются другие методы определения жизнеспособности, для обеспечения надлежащего качества сообщаемых результатов следуйте общим рекомендациям по работе в лаборатории и процедурам контроля качества, принятым в вашей лаборатории.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

www.beckmancoulter.com

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контрольные клетки Stem-Trol

REF IM3632

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Контрольные клетки Stem-Trol Control Cells — аналитический продукт для контроля качества для анализа иммунофенотипирования с использованием реагентов мионоклональных антител CD45 и / или CD34 и проточной цитометрии. Он предоставляет положительный клеточный контроль, который обрабатывается таким же образом, как образец крови, когда контрольные клетки Stem-Trol Control Cells вводят в пробу периферической цельной крови. Это обеспечивает проверку работы реагента и методов, используемых для окрашивания целевых клеток (т. е. CD34+ гематопоэтические клетки-предшественники (HPC)), лизирования эритроцитов и анализа проб методом проточной цитометрии.

См. вкладыш к набору реагентов Stem-Kit (Ref. IM3630), чтобы получить полные инструкции в случае выполнения анализа вручную. Ознакомьтесь со stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP), прилагаемым к программному обеспечению системы stemCXP, чтобы получить полные инструкции относительно использования автоматического анализа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Анализ иммунофенотипирования с использованием проточной цитометрии включает в себя идентификацию и подсчет целевых клеток в биологических образцах. Интересующие образцы окрашивают моноклональными антителами и лизируют эритроцитами перед анализом проточной цитометрии. Требуется положительный клеточный контроль для проверки работы реагента, методов приготовления пробы и процедур окрашивания (1). Положительный клеточный контроль должен имитировать репрезентативные целевые клетки в отношении работы моноклональных антител, лизирования эритроцитов и анализ проточной цитометрии.

Контрольные клетки Stem-Trol Control Cells — жидкий препарат стабилизированных клеток, происходящих от KG-1a, имеющий экспрессию антигена и свойства окрашивания CD45 и CD34, репрезентативные для гематопоэтических клеток-предшественников CD34+.

ПРИНЦИП

Контрольные клетки Stem-Trol Control Cells являются консервированными клетками KG-1a, которые были модифицированы и стабилизированы для экспрессии эпитопов CD34 класса III (2) и общего антигена лейкоцитов CD45 с плотностью, приближающейся к нормальным незрелым человеческим кроветворным клеткам. Смесь контрольных клеток Stem-Trol Control Cells, добавленную в нормальную свежую цельную кровь, сначала окрашивают реагентами моноклональных антител и красителем жизнеспособности 7-AAD, а затем лизируют для удаления эритроцитов. Флуоросферы Stem-Count или Flow-Count добавляют для прямого определения абсолютного количества. Анализ проточной цитометрии окрашенного и лизированного препарата определяет абсолютное количество целевых клеток. Ожидаемые результаты определяют с помощью реагентов Stem-Kit на валидированных и стандартизированных системах проточной цитометрии FC 500 с программным обеспечением системы CXP (версия 2.0) для анализа проб.

РЕАГЕНТЫ

Контрольные клетки Stem-Trol Control Cells суспендируются в изотоническом растворе, содержащем стабилизаторы и BSA. Аналитическую концентрацию клеток (клеток/мкл) получают по нескольким повторам анализа с использованием справочного метода. Специфическое значение указано на этикетке флакона.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. С образцами, пробами и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с потенциально передающими инфекционные заболевания и утилизировать их с соблюдением соответствующих мер предосторожности.
2. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов или реагентов на кожу и слизистые оболочки.
3. Не применяйте реактивы после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
4. Не замораживайте реагенты.
5. Не подвергайте реагент нагреву во время хранения или использования.
6. Избегайте испарения и утечки реагента, плотно закрывая флаконы с реагентом после использования, во избежание получения ошибочных результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Контрольные клетки Stem-Trol Control Cells осаждаются при длительном хранении. Перед использованием убедитесь, что клетки полностью возвращены в состояние суспензии. Избегайте избыточного перемешивания, чтобы свести к минимуму образование пузырьков воздуха. Во избежание получения ошибочных результатов не пипетируйте пузырьки воздуха.
8. Используйте калиброванную пипетку прямого вытеснения или репитер-пипетку для дозирования проб и контрольных клеток Stem-Trol Control Cells, или возможно получение ошибочных результатов.
9. Чтобы избежать получения ошибочных результатов и правильно и точно пипетировать пробы и контрольные клетки Stem-Trol Control Cells, используйте техники пипетирования, рекомендованные производителем пипетки.
10. Каждая партия контрольных клеток Stem-Trol Control Cells имеет определенную концентрацию клеток. Убедитесь, что используется правильная аналитическая концентрация при определении результатов определения абсолютного количества клеток-мишеней.
11. 6.8 При нарушении времени инкубации и перемешивания или температурного режима возможно получение недостоверных результатов.
12. 6.10 При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
13. 6.13 Рекомендуется использовать те же лизирующие растворы, антитела и проточные цитофлуориметры, что использовались для вычисления ожидаемых результатов, в противном случае полученные результаты могут отличаться от ожидаемых.
14. При работе с реагентами выполняйте правила надлежащей лабораторной практики.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

SDS Паспорт безопасности доступен на сайте techdocs.beckmancoulter.com

ХРАНЕНИЕ, СТАБИЛЬНОСТЬ И УТИЛИЗАЦИЯ

- Стабильность реагента: невскрытый реагент стабилен до истечения срока годности, указанного на флаконе, при хранении при температуре 2–8°C. Не используйте по истечении срока хранения. Вскрытый флакон стабилен в течение 30 дней.
  Вскрытые флаконы следует после использования плотно закрыть и хранить при температуре 2–8°C. Не замораживайте.
- Доведите контрольные клетки Stem-Trol Control Cells до комнатной температуры (18–25°C) перед использованием.

ВАЖНО: Риск получения ошибочных результатов в случае утечки контрольных клеток Stem-Trol Control Cells. После вскрытия контрольные клетки Stem-Trol Control Cells необходимо хранить в вертикальном положении во избежание возможности утечек. Не следует использовать реагенты, если наблюдаются признаки утечки.

Признаки непригодности

Невозможность получения ожидаемых результатов или сдвиг свойств светового рассеяния или флуоресценции может указывать на ухудшение качества продукта. Также следует проверить стандартизацию инструмента, технику приготовления пробы и характеристики антител.

Любое изменение внешнего вида контрольных клеток Stem-Trol Control Cells (нормальный внешний вид — бесцветная жидкость) или значительное изменение (изменение абсолютного количества >15%) значений, полученных при повторных тестах анализа проточной цитометрии могут указывать на ухудшение качества, и реагент не следует использовать далее.

Подготовка реагентов

Контрольные клетки Stem-Trol Control Cells являются готовой к использованию суспензией. Требуется надлежащее смешивание (обработка на вортексе в течение 10–12 секунд) до каждого первого пипетирования из флакона. Избегайте избыточного перемешивания, чтобы свести к минимуму образование пузырьков воздуха. Не пипетируйте пузырьки воздуха.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Деионизированная вода.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Stem-Kit Reagents (REF IM3630), в том числе краситель жизнеспособности 7-AAD.
- Альтернатива Stem-Count Fluorospheres: Flow-Count Fluorospheres (REF. 7547053)
- Ледяная ванна.
- Пластиковые пробирки (12 x 75 мм).
- Калиброванная пипетка прямого вытеснения (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) и наконечники или калиброванная репитер-пипетка (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) и наконечники.
- Калиброванные стандартные пипетки (20 мкл, 100 мкл, 2 мл) и наконечники.
- Мешалка типа Вортекс (вихревой смеситель).
- Таймер.
- Проточный цитометр.
- Программное обеспечение системы stemCXP ТОЛЬКО для автоматизированного анализа контрольных клеток Stem-Trol Control Cells на проточных цитометрах FC 500 с программным обеспечением CXP.

ПРОЦЕДУРА

Для получения полных инструкций по автоматическому анализу см. stemCXP System Guide (Руководство по системе stemCXP), которое прилагается к программному обеспечению системы stemCXP и содержит полные инструкции.

Чтобы провести анализ вручную, см. вкладыш в упаковку Stem-Kit Reagents и следующую процедуру.

ЗАМЕЧАНИЕ: Для стандартизации анализа выполняйте проверку процесса путем окрашивания контрольных клеток Stem-Trol Control Cells с пробой нормальной периферической крови от здорового донора при получении новых реагентов Stem-Kit Reagents и затем ежедневно. Кроме того, так как контрольные клетки Stem-Trol Control Cells являются стабилизированными клетками (т. е. нежизнеспособными клетками), можно визуально проверить окрашивание красителем жизнеспособности 7-AAD на контрольных клетках Stem-Trol Control Cells (см. заголовок «Создание гистограммы»).

Убедитесь, что проточный цитометр надлежащим образом отрегулирован и стандартизирован на интенсивность флуоресценции в соответствии с рекомендациями производителя и лаборатории. Убедитесь, что настройки компенсации флуоресценции надлежащим образом скорректированы в соответствии с рекомендациями производителя и лаборатории.

Доведите контрольный реагент и антитела до комнатной температуры.

Для каждого эксперимента пометьте одну пробирку: TROL 45/34/7-AAD.

1. Пипетируйте 20 мкл CD45-FITC / CD34-PE в пробирку.
2. Добавьте в пробирку пипеткой 20 мкл красителя жизнеспособности 7-AAD.

   ВАЖНО: Риск неполного лизиса, если образец крови остается в верхней части или на боковой стороне тестовой пробирки. Выполняйте пипетирование с осторожностью, чтобы избежать попадания крови на верхнюю или боковую часть тестовой пробирки. Очистите пробирку ватным шариком, если требуется, чтобы удалить все следы образца крови с верхней или боковой части тестовой пробирки.

3. На дно пробирки осторожно перенесите пипеткой 100 мкл хорошо перемешанной пробы цельной крови, используя калиброванную пипетку прямого вытеснения или репитер-пипетку.
4. Приготовьте и добавьте Stem-Trol:

- Обработайте на вортексе контрольные клетки Stem-Trol Control Cells в течение 5 секунд.
- Осторожно перенесите пипеткой 20 мкл контрольных клеток Stem-Trol Control Cells в пробирку.
- Обработайте пробирки на вортексе в течение 5 секунд.

5. Инкубируйте при комнатной температуре (18–25°C) в течение 20 мин, в защищенном от света месте.
6. Добавьте 2 мл приготовленного лизирующего раствора 1X NH_4Cl Lysing Solution в пробирку и незамедлительно обработайте на вортексе в течение 5 секунд.
   Сведения о приготовлении лизирующего раствора см. на вкладыше в упаковку Stem-Kit Reagents.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 мин, в защищенном от света месте.
8. Храните пробирки в штативе на льду (2–8°C), защищая от света.

ВАЖНО: Риск ошибочных результатов в случае пипетирования пузырьков воздуха. Излишнее перемешивание Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres может привести к созданию пузырьков воздуха. Не перемешивайте чрезмерно Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres и не пипетируйте пузырьки воздуха в пробирки в пробой.

9. Осторожно перемешайте Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres, переворачивая флакон 3–5 раз перед использованием. Избегайте избыточного перемешивания, чтобы свести к минимуму образование пузырьков воздуха.
10. До сбора перенесите пипеткой 100 мкл Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres в пробирку.
11. Обрабатывайте на вортексе в течение 5 секунд сразу же после каждого добавления. Храните при 2–8°C. Повторите обработку на вортексе непосредственно перед сбором данных проточной цитометрии.

ВАЖНО: Риск получения ошибочных результатов в случае анализа пробы через более чем 1 час после добавления Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres. Анализ приготовленных проб следует выполнить в течение 1 часа после добавления Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres.

Сводка по приготовлению (этикетка пробирки: TROL45/34/7-AAD)

Реагенты и пробы	Объем
CD45-FITC / CD34-PE	20 мкл
Краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для анализа жизнеспособности клеток	20 мкл
Цельная кровь	100 мкл
Stem-Trol Control Cells	20 мкл
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 20 минут. Хранить в темном месте	
1X NH_4Cl Lysing Solution	2 мл
Обработайте на вортексе — инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 минут. Хранить в темном месте	
Stem-Count Fluorospheres	100 мкл

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕГИОНОВ СЕЛЕКЦИИ ВРУЧНУЮ И МЕТОД АНАЛИЗА

Настройка протокола

Проточный цитометр должен быть оборудован средствами детекции прямого рассеяния, бокового рассеяния и четырех каналов флуоресценции. Для канала FL3 (для мониторинга Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres) используйте полосовой фильтр диапазонов 620 нм. Для канала FL4 (для мониторинга красителя жизнеспособности 7-AAD) используйте длинноволновой фильтр 675 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЗАМЕЧАНИЕ: Такие схема регионов селекции и серия из 8 гистограмм, как указано для анализа образца, должны использоваться для контрольных клеток Stem-Trol Control Cells. Так как контрольные клетки Stem-Trol Control Cells по характеристикам размера приближены к размерам нормальных незрелых кроветворных клеток, и экспрессируют антигены CD45 и CD34 с приблизительно такой же плотностью, отсутствует необходимость менять границы регионов по каналам Forward Scatter (Прямое рассеяние), Fluorescence 1 (Флуоресценция 1) и Fluorescence 2 (Флуоресценция 2). Однако, так как характеристики бокового рассеяния контрольных клеток Stem-Trol Control Cells являются уникальными, можно скорректировать границы региона по боковому рассеянию. Регионы A, B, C и D (определения регионов см. под заголовком «Создание региона») должны быть изменены, чтобы включать кластер характеристик контрольных клеток Stem-Trol Control Cells.

Построение гистограмм

Создайте гистограммы следующим образом:

1. Создайте гистограмму 1 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
2. Создайте гистограмму 2 как FL2 CD34-PE относительно бокового рассеяния.
3. Создайте гистограмму 3 как FL1 CD45-FITC относительно бокового рассеяния.
4. Создайте гистограмму 4 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
5. Создайте гистограмму 5 как FL1 CD45-FITC относительно FL2 CD34-PE.
6. Создайте гистограмму 6 как прямое рассеяние относительно бокового рассеяния.
7. Создайте гистограмму 7 как время относительно FL3 Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres.
8. Создайте гистограмму 8 как FL4 7-AAD относительно бокового рассеяния.

Гистограммы 1–4 предназначены для описания гематопоэтических клеток-предшественников $CD34^+$, этот процесс можно отложить до этапа анализа. Эти первые четыре гистограммы настраиваются согласно ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (Руководство ISHAGE по определению клеток $CD34^+$ методом проточной цитометрии) (2,3).

Гистограммы 5–7 предназначены для мониторинга параметров, которые имеют значение на этапе сбора. Сюда входит дискриминатор прямого рассеяния, количество событий $CD45^+$ для сбора и правильное накопление синглетов флуоросфер.

Гистограмма 8 предназначена для дифференциации жизнеспособных и нежизнеспособных событий и анализа, когда требуется.

Создание регионов

Создайте следующие регионы:

1. Гистограмма 1 — создайте прямолинейный регион A, включающий все лейкоциты $CD45^+$ и исключающий тромбоциты, остатки эритроцитов и скопления.
2. Гистограмма 1 — создайте аморфный регион E по лимфоцитам (яркие CD45, низкое боковое рассеяние).
3. Гистограмма 2 — создайте прямолинейный регион B на гистограмме 2, включающий все события $CD34^+$ с низким или средним боковым рассеянием. Установите предел подсчета 75 000 событий (события $CD45^+$) на гистограмме 2.
4. Гистограмма 3 — создайте аморфный регион C на гистограмме 3, включающий все объединенные события $CD45^{dim}$.
5. Гистограмма 4 — создайте аморфный регион D на гистограмме 4, включающий все объединенные события со средним боковым рассеянием и средним или высоким прямым рассеянием.
6. Гистограмма 5 — создайте квадрант-регион I на гистограмме 5 для проверки нижнего предела экспрессии CD45 на событиях $CD34^+$.
7. Гистограмма 5 — создайте аморфный регион H на гистограмме 5, чтобы окружить все Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres, включая дублеты. Регион H должен быть расположен в верхнем правом углу гистограммы 5.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЗАМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что регион H обозначен как регион AMORPHOUS (Аморфный).

8. Гистограмма 6 — копируйте регион D с гистограммы 4 как регион F на гистограмме 6.
9. Гистограмма 7 — создайте прямолинейный регион G на гистограмме 7, включающий только синглеты Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres. Регион G можно отметить как «CAL» (Калибровка), чтобы обеспечить автоматический подсчет абсолютного количества гематопоэтических клеток-предшественников $CD34^+$ (дополнительные сведения см. в руководстве по инструменту).
10. Гистограмма 8 — создайте прямолинейный регион J на гистограмме 8 для отделения жизнеспособных лейкоцитов (отрицательные события 7-AAD) от нежизнеспособных событий (преимущественно контрольных клеток Stem-Trol Control Cells, положительных на окрашивание 7-AAD).

Создание гейтов

Создайте области селекции следующим образом:

1. Гистограмма 1 — выполните назначение «H» гистограмме 1 для отображения всех событий, за исключением всех Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres. См. руководство по инструменту для создания «not gates. »
2. Гистограмма 2 — выполните назначение «A» гистограмме 2 для отображения всех событий $CD45^+$.
3. Гистограмма 3 — выполните назначение «A» и «B» (AB) гистограмме 3 для отображения всех событий $CD45^+$ $CD34^+$.
4. Гистограмма 4 — выполните назначение «A», «B» и «C» гистограмме 4 для отображения всех объединенных событий $CD45^+$ $CD34^+$ с низким или средним боковым рассеянием и низкой экспрессией окрашивания CD45. События из региона ABCD являются действительными гематопоэтическими клетками-предшественниками $CD34^+$.
5. Гистограмма 5 — без селектора для отображения всех событий.
6. Гистограмма 6 — выполните назначение «E» для отображения лимфоцитов как визуальную проверку по дискриминатору.
7. Гистограмма 7 — выполните назначение «H» гистограмме 7, чтобы отобразить все Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres, включая дублеты.
8. Гистограмма 8 — выполните назначение «A» гистограмме 8 для отображения событий $CD45^+$.

Настройка проточного цитометра

1. Убедитесь, что проточный цитометр надлежащим образом отрегулирован и стандартизирован на световое рассеяние и интенсивность флуоресценции в соответствии с рекомендациями производителя и лаборатории. Убедитесь, что настроена цветовая компенсация для стандартной работы. Дополнительные инструкции см. в руководстве по инструменту.
2. Обработайте тестовые пробирки на вортексе в течение 5 секунд.
3. Выполните сбор данных на проточном цитометре. Следует проанализировать не менее 75 000 событий $CD45^+$.
4. Скорректируйте дискриминатор и регионы путем анализа пробирки TROL 45/34/7-AAD.

Пример анализа

Гистограммы, содержащиеся в ПРИЛОЖЕНИИ, отображаются в порядке возрастания номеров, как показано в протоколе.

Расчет контрольных клеток $CD34^+$ Stem-Trol Control Cells

Использование результатов проточной цитометрии, автоматически скорректированных с аналитической концентрацией Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres, полученных с использованием программного обеспечения System II (версия 3.0) и проточного цитометра COULTER EPICS XL/XLMCL.

Чтобы получить автоматически рассчитываемые определения абсолютного количества на проточных цитометрах COULTER EPICS XL / XL-MCL, необходимо ввести правильную аналитическую концентрацию Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres до сбора пробы.

Введите «CAL» (Калибровка) как имя региона G синглетов Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres и введите значение, например, 1000, в поле CAL FACTOR (Коэффициент калибровки) на экране диалогового окна STATISTICS (Статистика) меню SET-UP SCREEN PROTOCOL (Протокол настройки экрана).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ввод коэффициента калибровки для Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres:

1. На экране Acquisition Run (Прогон сбора) выберите Setup Screen (Настройка экрана) >> Protocol (Протокол).
2. Выберите Statistics (Статистика) >> CAL FACTOR (Коэффициент калибровки).
3. Введите число коэффициента CAL (Калибровка) (аналитическая концентрация) из флакона Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres.
4. Нажмите ENTER (Ввод).
5. Выберите OKAY (ОК).
6. В строке введите «Y» (Да).

При сборе по меньшей мере 1000 синглетов флуоросфер абсолютное количество для контрольных клеток Stem-Trol Control Cells $CD34^+$ автоматически корректируется и может быть взято непосредственно из результатов распечатки статистики по региону D.

Таблица (ниже):
Пример статистики, полученный с пробиркой TROL 45/34/7-AAD на программном обеспечении System II, с использованием функции CAL FACTOR (Коэффициент калибровки), где:

- 1024 — аналитическая концентрация Stem-Count Fluorospheres.
- 5248 — общее количество флуоросфер, накопленных в регионе CAL (Калибровка) в течение всего времени сбора.

В этом примере все подсчеты скорректированы на число: 1024/5248.

Статистика: не нормализованная гистология		**Перечень регионов селекции: код отключенного региона**	**Скорректированный подсчет (клеток/мкл)**
1	A	LEUKS	9 798
2	B	CD34 POS	279
3	C	CD45 DIM	264
4	D	Stem-Trol Control Cells	248
7	G	CAL 1024	1 024
5	H	Все Stem-Count Fluorospheres	1 046

1. Запишите скорректированные значения абсолютного количества (клеток/мкл) в регионах D от пробирок TROL 45/34/7-AAD.

Пример:

Пробирка TROL 45/34/7-AAD: контрольные клетки Stem-Trol Control Cells = 248 клеток/мкл.

2. Умножьте это точное число на коэффициент нормализации (N) = 5.

ЗАМЕЧАНИЕ:

Необходимо нормализовать абсолютное количество контрольных клеток Stem-Trol Control Cells относительно добавленных объемов во время теста: определите N путем деления объема справочных данных подсчета (синглетов Stem-Count Fluorospheres) на объем контрольных клеток Stem-Trol Control Cells, добавленных в тестовую пробирку.

Пример:

100 мкл Stem-Count Fluorospheres добавлены к 20 мкл контрольных клеток Stem-Trol Control Cells:

N = 100 ÷ 20 = 5

Нормализованное абсолютное количество контрольных клеток Stem-Trol Control Cells = 248 x 5 = 1240 клеток/мкл.

3. Проверьте абсолютное количество контрольных клеток Stem-Trol Control Cells, полученное путем сравнения с контрольными клетками Stem-Trol Control Cells.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Аналитическая концентрация (клеток/мкл), указанная на этикетке флакона. Полученное абсолютное количество контрольных клеток Stem-Trol Control Cells должно находиться в пределах ±15% от аналитической концентрации Stem-Trol Control Cells. Теперь валидованы метод окрашивания и процесс лизирования.

Пример:

Аналитическая концентрация контрольных клеток Stem-Trol Control Cells = 1380 клеток/мкл.

Диапазон приемлемых значений: 1173–1587 (1380 ± 207) клеток/мкл

Нормализованное абсолютное число = 1240 клеток/мкл находится в пределах диапазона.

ВАЖНО:

Если абсолютное количество контрольных клеток Stem-Trol Control Cells выходит за пределы диапазона приемлемых значений, определите, правильно ли выполнено пипетирование, особенно для Stem-Count или Flow-Count Fluorospheres и контрольных клеток Stem-Trol Control Cells. Визуально проверьте отчеты проточной цитометрии и качество окрашивания и процесс лизирования в тестовых пробирках. Проверьте способ установки границ региона. Если требуется, повторите приготовление с новыми тестовыми пробирками. Выполните сбор и проанализируйте как новую, так и предыдущую серию пробирок. Сравните два результата. Если отсутствует соответствие, обратитесь в местное представительство компании Beckman Coulter.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

www.beckmancoulter.com

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru