

IOTest® CD5-PE

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07753

100 тестов; 2 мл
20 мкл / тест



IOTest
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



Спецификации	
Специфичность	CD5
Клон	BL1a
Гибридома	SP2/0-Ag14 x Balb/c
Иммуноген	Лимфоциты из грудного лимфатического протока
Иммуноглобулин	IgG2a
Вид животных	Мышь
Источник	Асциты
Способ очистки	Аффинная хроматография с иммобилизованным белком А
Флуорохром	Фикоэритрин R (PE)
λ возбуждения	488 нм
Пик эмиссии	575 нм
Буфер	PBS pH 7.2, БСА 2 мг/мл, 0.1% NaN ₃

НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела позволяют идентифицировать клетки, экспрессирующие антиген CD5, и выполнить их подсчет. Для анализа используются биологические образцы человека. Исследование проводится методом проточной цитофлуориметрии.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами на поверхности лейкоцитов.

При инкубации образца с реагентом IOTest происходит окрашивание лейкоцитов. Затем выполняется лизис эритроцитов. Интактные лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить интересующую популяцию на диаграмме, отображающей светорассеяние в боковом направлении (Side Scatter или SS) и светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (Forward Scatter или FS). Для выбора популяций можно использовать различные двупараметровые диаграммы в зависимости от используемого приложения.

Прибор выполняет анализ флуоресценции выбранной популяции, распознавая окрашенные и неокрашенные клетки. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Молекула CD5 является полезным маркером для идентификации определенных лимфопрлиферативных синдромов при условии использования дополнительных иммунофенотипирующих маркеров. Так, коэкспрессия CD5 и CD19 позволяет дифференцировать хронический В-клеточный лимфолейкоз (В-CLL: CD5⁺ CD19⁺) и Т-клеточные лимфопрлиферативные синдромы (CD5⁺ CD19⁻) (1, 2).

Одновременный анализ антигенов CD5, CD19 и CD23 позволяет более точно различить разные формы пролиферации В-клеток, например, хронический В-клеточный лимфолейкоз и мелкоклеточную лимфому (CD5⁺CD23⁺CD19⁺) и лимфому зоны мантии (CD5⁺CD23⁻CD19⁺) (1 – 6).

Одновременный анализ CD5, CD19 и CD10 помогает охарактеризовать различные В-клеточные неопластические образования (7), такие как хронический В-клеточный лимфолейкоз и мелкоклеточная лимфома (CD5⁺CD10⁻CD19⁺), а также фолликулярная лимфома (CD5⁻ CD10⁺CD19⁺) (2, 3). Данный анализ также позволяет различить В-клеточный острый лимфобластный лейкоз и пре-В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (CD5⁻CD10⁺CD19⁺) от пролимфоцитарного лейкоза (CD5⁻CD10⁻CD19⁺) (2).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

До и после распечатки флакона жидкие конъюгаты антител необходимо хранить при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность нераспечатанного реагента приводится на этикетке флакона.

Стабильность распечатанного реагента 90 дней.

ВНИМАНИЕ

1. Не используйте реагент с истекшим сроком годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием необходимо уравновесить реагент при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Воздействие света необходимо свести к минимуму.
5. Избегайте контаминации микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN₃), требуют осторожного обращения. Не проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистой оболочкой и глазами. В кислой среде азид натрия способен образовывать взрывоопасную азотистоводородную кислоту. При утилизации перед сливом в водопровод рекомендуется развести реагент большим объемом воды. Это позволит избежать накопления азидов натрия в металлических трубах и предотвратит образование взрывчатого вещества.
7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности (в частности, рекомендуется использовать защитные перчатки, халат и очки).
8. Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом. Избегайте контакта образца с кожей, слизистой оболочкой и глазами.
9. После завершения работы пробирки с кровью и все одноразовые материалы необходимо поместить в специальные контейнеры для утилизации.

ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отобрать в стерильные пробирки с солью EDTA в качестве антикоагулянта. Использование других антикоагулянтов не рекомендуется.

Образцы должны храниться при комнатной температуре (18 – 25°C). Встряхивание образцов не допускается. Перед отбором аликвоты образец следует гомогенизировать, аккуратно перемешав. Анализ образцов необходимо выполнить в течение 24 часов после отбора.

МЕТОДИКА

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пробирки и материалы для отбора проб.
- Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками на 20, 100 и 500 мкл.

- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные частицы: флуоросферы Flow-Set™ (кат. № 6607007).
- Реагент для лизиса эритроцитов (с предусмотренной стадией отмывки после лизиса). Например: VersaLyse (кат. № A09777).
- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Отрицательный контроль: изотипический контроль - конъюгаты PE с мышиным IgG2a.
- Буфер (PBS: 0.01 М фосфат натрия; 0.145 М хлорид натрия; pH 7.2).
- Центрифуга.
- Миксер (вортекс).
- Проточный цитофлуориметр.

ПОДГОТОВКА ПРОБ

ЗАМЕЧАНИЕ: Приведенная ниже процедура пригодна для стандартных исследований. При выполнении некоторых приложений Beckman Coulter объем образца и/или реагента VersaLyse может отличаться. В этом случае следуйте указаниям руководства для конкретного приложения. При исследовании любого образца необходимо также проанализировать контрольный образец (исследуемый образец плюс изотипический контроль).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител IOTest, а в пробирки для анализа контролей – необходимое количество изотипического контроля.
2. В пробирки для анализа образца и для анализа изотипического контроля добавьте по 100 мкл образца. Аккуратно перемешайте на вортексе.
3. Инкубируйте в течение 15 - 20 минут при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Если требуется, выполните лизис эритроцитов, следуя рекомендациям изготовителя лизирующего реагента. Например, при использовании реагента VersaLyse (кат. № A09777) следуйте указаниям инструкции к этому реагенту. **Рекомендуется выполнить процедуру «с одновременной фиксацией».** Для этого добавьте к образцу 1 мл свежеприготовленного раствора для фиксации и лизиса. Немедленно перемешайте на вортексе в течение 1 секунды. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если образец не содержит эритроцитов, добавьте 2 мл PBS.
5. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 150 x g при комнатной температуре.
6. Удалите супернатант аспирацией.
7. Ресуспандируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспандируйте клетки:
 - в 0.5 или 1 мл PBS с 0.1% раствором формальдегида, если подготовленная проба будет храниться от 2 до 24 часов. (Данный

раствор можно получить разведением 12.5 мкл реагента IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800) в 10-кратной концентрации в 1 мл PBS.)

- в 0.5 или 1 мл PBS без формальдегида, если подготовленная проба будет проанализирована в течение 2 часов.

ЗАМЕЧАНИЕ: Независимо от способа подготовки, подготовленные пробы необходимо хранить при температуре 2 - 8°C в защищенном от света месте.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD5 экспрессируется на поверхности зрелых Т-лимфоцитов, большинством тимоцитов и субпопуляцией В-лимфоцитов (8 – 10). Ее экспрессия гранулоцитами, моноцитами и тромбоцитами не обнаружена (10).

В 1986 г. на Третьем международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Оксфорде, Англия, было подтверждено, что моноклональные антитела (mAb) BL1a направлены против CD5 (Code WS: 520, Section T) (8, 9).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии MOLT4 и отрицательные клетки линии RPMI. Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии с описанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия. Уравнение регрессии можно использовать для определения линейности и диапазона измерений.

Маркер	Линейная регрессия	Линейность (R ²)	Диапазон (%)
CD5	$Y = 1.00 X + 0.09$	0.9998	1 – 99

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна определить собственные диапазоны нормальных значений на основании исследования образцов нормальных доноров местной популяции. При этом следует учитывать возраст, пол и этническую принадлежность доноров, а также другие местные особенности населения.

В наших лабораториях было проведено исследование образцов цельной крови 50 взрослых людей с использованием реагента IOTest 3 CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD (кат. № A07710). В следующей таблице представлены результаты определения процентного содержания положительных событий (CD5⁺-лимфоцитов):

Лимфоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD5 ⁺	50	73	7.7	10.5

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялось процентное содержание окрашенных клеток целевой популяции (лимфоцитов). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD5 ⁺	12	73	2.7	3.7

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялось процентное содержание окрашенных положительных клеток (лимфоцитов). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD5 ⁺	12	73	2.7	3.7

Цитометр # 2

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD5 ⁺	12	76	0.7	1.0

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

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

2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры без отмывки.
3. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормам лабораторной работы.
4. Антитела данного реагента откалиброваны для получения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго дозировать указанный объем реагента с учетом количества клеток в образце.
5. При гиперлейкоцитозе разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию лейкоцитов 5×10^9 /л.
6. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может происходить медленно, не полностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фикола).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В приложении приводится список литературы и примеры диаграмм.

ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, EXPO, Flow-Set, IOTest, System II, XL являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

BD FACScan является зарегистрированным торговым знаком компании BD Biosciences and Company.

ИЗГОТОВЛЕНО:

IMMUNOTECH S.A.
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France

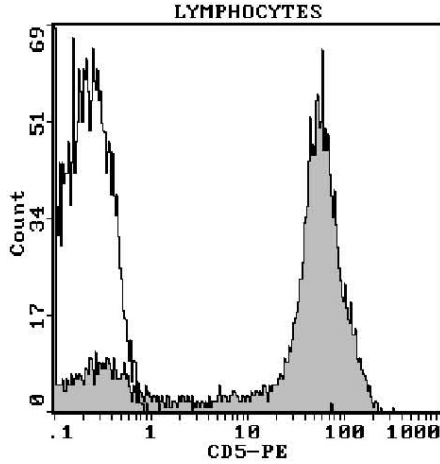
Отдел по работе с клиентами: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

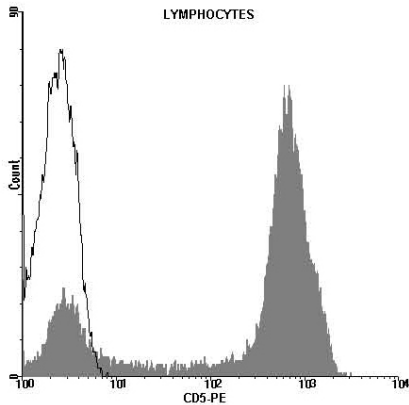


ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ

Ниже показаны однопараметровые гистограммы (количество клеток – интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD5-PE (кат. № A07753). Выполнялось выделение лимфоцитов программными средствами. Изотипический контроль - конъюгаты PE с мышинным IgG2a, показан белым цветом.



Гистограмма 1. Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™.



Гистограмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Vecton Dickinson FACScan™.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rothe, G., Schmitz, G., Adorf, D., Barlage, S., Gramatzki, M., Höffkes, H.G., Janossy, G., Knüchel, R., Ludwig, W.D., Nebe, T, Nerl, C., Orfao, A., Serke, S., Sonnen, R., Tichelli, A., Wörmann, B., "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies", 1996, *Leukemia*, 10, 877-895.
2. Jennings, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, *Blood*, 8, 90, 2863-2892.
3. Rosenberg, S.A., "Classification of lymphoid neoplasms", 1994, *Blood*, 5, 84, 1359-1360.
4. Kilo, M.N., Dorfman, D.M., "The utility of flow cytometric immunophenotypic analysis in the distinction of small lymphocytic lymphoma / chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma", 1996, *Am. J. Clin. Pathol.*, 105, 451-457.
5. Borowitz, M.J., Bray, R., Gascoyne, R., Melnick, S., Parker, J.W., Picker, L., Stetler-Stevenson, M., "U.S. Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Data analysis and interpretation", 1997, *Cytometry*, 30, 236-244.
6. Stewart, C.C., Behm, F.G., Carey, J.L., Cornbleet, J., Duque, R.E., Hudnall, S.D., Hurtubise, P.E., Loken, M., Tubbs, R.R., Wormsley, S., "U.S. Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: selection of antibody combinations", 1997, *Cytometry*, 30, 231-235.
7. Braylan, R C., Orfao, A., Borowitz, M J., Davis, B H., "Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting" 2001, *Cytometry*, 46, 23-27.
8. Horejsi, V., Angelisova, P., "Comparatives biochemical studies on the Workshop CD5 and CD3 panel antibodies", 1987, *Leucocyte Typing III*, White Cell Differentiation Antigens, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 197.
9. Disanto, J.P., Small, T.N., Dupont, B., Flomenberg, N., Knowles, R.W., "Analysis of human CD8 and CD5 antigens expressed on mouse L-lines", 1987, *Leucocyte Typing III*, White Cell Differentiation Antigens, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 210-214.
10. Reiter, C., "Cluster report: CD5", 1989, *Leucocyte Typing IV*, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 331-332.