

ЮТест® CD10-PE

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07760

100 тестов; 2 мл
20 мкл / тест



ЮТест
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



Спецификации	
Специфичность	CD10
Клон	ALB1
Гибридома	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Лейкозные клетки человека
Иммуноглобулин	IgG1
Вид животных	Мышь
Источник	Асциты
Способ очистки	Ионообменная или аффинная хроматография
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 CD10, 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 ЮТест 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 двухпараметровые 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

Анализ экспрессии антигена CD10 в сочетании с другими маркерами полезен при характеристике различных лейкозов (1).

Одновременный анализ CD20, CD10 и CD19 помогает охарактеризовать различные неопластические трансформации В-клеток (2), такие как хронический В-клеточный лимфолейкоз, мелкоклеточная лимфома (CD20⁺CD10⁻) и фолликулярная лимфома (CD20⁺CD10⁺) (3, 4). Данная комбинация маркеров также помогает дифференцировать острый В-клеточный и пре-В-клеточный лимфобластный лейкоз (CD20⁺CD10⁺) и пролимфоцитарный лейкоз (CD20⁺CD10⁻) (2). Можно выделить две группы острого В-клеточного лимфолейкоза: CD10⁺ и CD10⁻, первая группа имеет более благоприятный прогноз (3). Около 60% случаев острого лимфобластного лейкоза у детей характеризуются транслокацией 11q23 с фенотипом CD10⁻ (клетки-предшественницы В-лимфоцитов и плазмобласты) (3).

И наконец, пре-В-клетки (CD19⁺CD10⁺), присутствующие после химиотерапии или трансплантации костного мозга, можно отличить от резидуальных лейкозных клеток фенотипа CD19⁺CD10⁺ по различной экспрессии CD20 (3).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

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

Стабильность 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, 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.

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.

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 гемоллиза.
- 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: ЮТест 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Изотипический контроль: ЮТест reagent. IgG1-PE (кат. № A07796).
- 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, кат. № A07796).

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте по 20 мкл конъюгатов антител ЮТест, а в пробирки для анализа контролей – по 20 мкл 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. Ресуспендируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспендируйте 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

Моноклональные антитела (mAb) ALB1 были исследованы на Первом международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Париже, Франция, в 1982 г. (5).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии RAMOS и отрицательные клетки линии MOLT4. 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.

Маркер	Линейная регрессия	Линейность (R ²)
CD10	$Y = 0.99 X + 0.26$	0.9996

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 с использованием данного реагента было проведено исследование образцов цельной крови 50 взрослых людей. В следующих таблицах представлены результаты подсчета положительных событий:

Лимфоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	50	1.50	2.14	143

Гранулоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	50	95.31	3.56	3.73

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	12	1.73	0.16	9.0

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 (%)
CD10 ⁺	12	1.73	0.16	9.0

Цитометр # 2

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD10 ⁺	12	2.14	0.21	9.6

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 объема образца.

5. При гиперлейкоцитозе разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию лейкоцитов $5 \times 10^9/л$.

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 моноуклеарные 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, VersaLyse и XL являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

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

ИЗГОТОВЛЕНО:

IMMUNOTECH
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 двухпараметровые диаграммы (светорассеяние в боковом направлении - интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD10-PE (кат. № A07760). Выполнялось выделение лейкоцитов программными средствами.

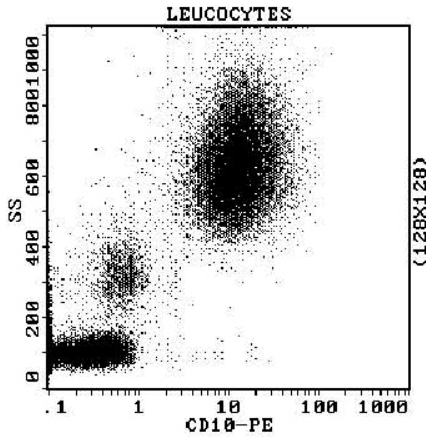


Диаграмма 1. Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™.

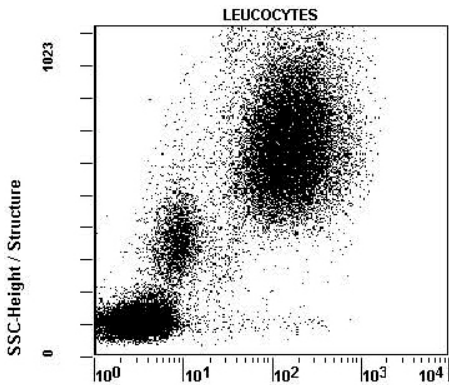


Диаграмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Vecton Dickinson FACScan™. Анализ выполнен в программном обеспечении EXPO™.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H.a.d Vardiman, J.W., Editors, « Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues », WHO Classification of Tumours, IARC Press, 2001.
2. Braylan, R.C., Orfao, A., Borowitz, M J., Davis, B H., "Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting" 2001, Cytometry, 46, 23-27.
3. Jenning, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, Blood, 90, 2863-2892.
4. Rosenberg, S.A., "Classification of lymphoid neoplasms", 1994, Blood, 84, 1359-1360.
5. Boucheix, C., Perrot, J.Y., Mirshahi, M., Fournier, N., Billard, M., Giannoni, F., Bernadou, A., Rosenfeld, C., "Monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia differentiation antigens", 1984, Leucocyte Typing I, Bernard, A. et al., Springer Verlag, 671-672.