

ЮТест® CD13-PE

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07762

100 тестов; 2 мл

20 мкл / тест



ЮТест
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
IN VITRO



Спецификации	
Специфичность	CD13
Клон	SJ1D1
Гибридома	SP2/0xBalb/c
Иммуноген	Клетки линии KG1
Иммуноглобулин	IgG1
Вид животных	Мышь
Источник	Асциты
Способ очистки	Ионообменная 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 CD13, 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

Антиген CD13 присутствует на клетках миелоидного ряда и на некоторых предшественниках миелоидных клеток. Этот маркер рекомендуется использовать при фенотипировании острого миелолейкоза (ОМЛ) (1, 2). Данный маркер в сочетании с другими миелоидными маркерами (миелопероксидазой и CD33), маркерами В-клеток (CD79 и CD19) и Т-клеток (CD3 и CD7) позволяет идентифицировать более 98% случаев острого лейкоза (1). Для классификации ОМЛ предложено использовать метод подсчета клеток. В данном случае рекомендуется использовать и другие миелоидные маркеры (такие как CD65, CD117, а также CD14, CD15, CD41, CD61, CD64 и гликофорин А) (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.

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

- Буфер (PBS: 0.01 M фосфат натрия; 0.145 M 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 IOTest, а в пробирки для анализа контролей – по 20 мкл соответствующего 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. Ресуспенсируйте осадок клеток в 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.
9. Удалите супернатант аспирацией и ресуспенсируйте 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 CD13, также известная как N-аминопептидаза, представляет собой трансмембранную металлопротеазу II типа с молекулярной массой 150 – 170 кДа. Молекула имеет большую внеклеточную последовательность и короткий цитоплазматический регион. С поверхностью клетки CD13 связывается нековалентно в виде гомодимера (4).

Антиген CD13 экспрессируется клетками гранулоцито-моноцитарного ряда на ранних стадиях (моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами) и их предшественниками (промежуточными предшественниками, формирующими колониобразующие единицы гранулоцитов и моноцитов (CFU-GM)) (4 – 7). Молекула CD13 также экспрессируется клетками негематопозитических тканей, такими как эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев, клетки, формирующие щеточную каемку кишечника, эндотелиальные клетки, фибробласты, клетки стромы костного мозга, остеокласты и базальные клетки желчных протоков (8).

Моноклональные антитела SJ1D1 взаимодействуют с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами и базофилами периферической крови. В 1986 г. на Третьем международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Оксфорде, Великобритания, было подтверждено, что мАТ SJ1D1 направлены против CD13 (WS Code: 285, Section M) (5).

ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии KG-1a и отрицательные клетки линии FRN 17.4.14.33. 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 (%)
CD13	$Y = 1.00 X + 0.10$	0.9997	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 с использованием данного реагента было проведено исследование образцов цельной крови 50 взрослых людей. В следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий:

Клетки / Маркер	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
Моноциты / CD13+	50	99.7	6.7	7.2
Гранулоциты / CD13+	50	99.3	0.8	0.8

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Положительные клетки / Маркер	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
Моноциты / CD13+	12	99.6	0.4	0.3
Гранулоциты / CD13+	12	100.0	0.0	0.0

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лабораториями определялось процентное содержание окрашенных положительных клеток (моноцитов и гранулоцитов периферической крови). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

Цитометр # 1

Положительные клетки / Маркер	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
Моноциты / CD13+	12	99.6	0.4	0.3
Гранулоциты / CD13+	12	100.0	0.0	0.0

Цитометр # 2

Положительные клетки / Маркер	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
Моноциты / CD13+	12	99.5	0.3	0.3
Гранулоциты / CD13+	12	100.0	0.0	0.0

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 двухпараметровые диаграммы (светорассеяние в боковом направлении - интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD13-PE (кат. № A07762). На диаграммах показана популяция лейкоцитов.

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

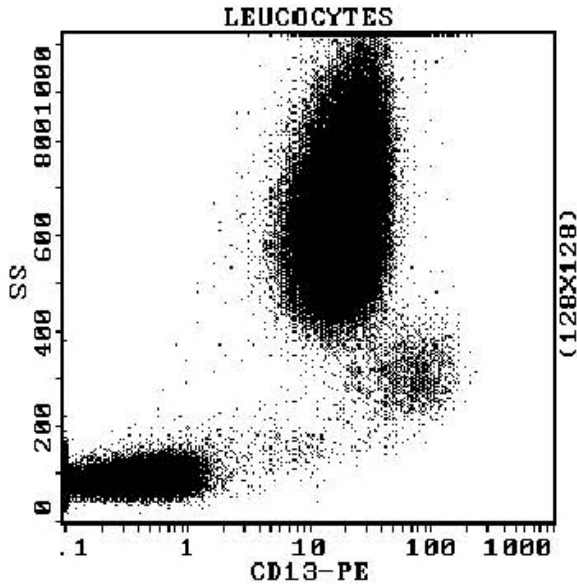
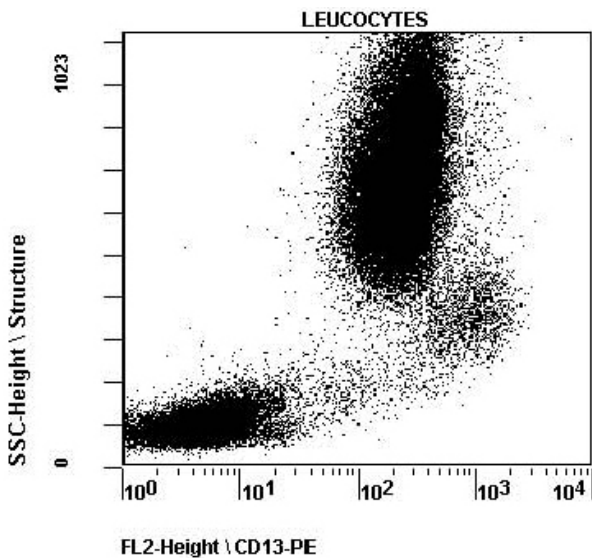


Диаграмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Becton Dickinson FACScan™. Анализ выполнен в программном обеспечении EXPO™.



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. Stewart, C.C., Behm, F.G., Carey, J.L., Combleet, 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.
3. Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., van't Veer, M.B., "Proposals for the immunological classification of acute leukemias", 1995, *Leukemia*, 9, 1783-1786.
4. Goyert, S.M., "CD 13 workshop panel report", 1997, *Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens*. Kishimoto, T., et al, Eds., Garland Publishing, Inc., 962-963.
5. Hogg, N., Horton, M.A., "Myeloid antigens, new and previously defined cluster", 1987, *Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens*, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 576-602.
6. Pierelli, L., Teopili, L., Menichella, G., Rumi, C., Paolini, A., Iovino, S., Puggioni, P.L., Leone, G., Bizzi, B., "Further investigations on the expression of HLA-DR, CD33 and CD13 surface antigens in purified bone marrow and peripheral blood CD34+ haematopoietic progenitor cells", 1992, *Br. J. Haematol.*, 83, 1-7.
7. Mirro, J., Melvin, S., Metzger, D., Look, A., Murphy, S., "Changes in cell surface antigen expression during myelocytic and monocytic cell differentiation", 1984, *Leucocyte Typing I*, Bernard, A. et al. Eds., Springer Verlag, 442-446.
8. Ashmun, R.A., Holmes, K.V., Shapiro, L.H., Favalaro, E.J., Razak, K., de Crom, R.P.G., Howard, C.J., Look, A.T., "CD13 (aminopeptidase N) cluster workshop report", 1995, *Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens*. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press., 771-775.