

# IOTest® CD19-PE

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07769

100 тестов; 2 мл

20 мкл / тест



IOTest  
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
IN VITRO



Спецификации	
Специфичность	CD19
Клон	J4.119
Гибридома	NS1 x Balb/c
Иммуноген	Клетки лимфомы SKLY18
Иммуноглобулин	IgG1, κ
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, BSA 2 мг/мл, 0.1% NaN <sub>3</sub>

## НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела позволяют идентифицировать клетки, экспрессирующие антиген CD19, 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 анализируемых 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

Характеристика и подсчет популяций В-лимфоцитов при нарушениях иммунной системы: иммунодефицитных состояниях, аутоиммунных заболеваниях, реакциях гиперчувствительности, вирусных инфекциях, восстановлении иммунной системы после пересадки костного мозга и/или органов. Фенотипирование субпопуляций CD19<sup>+</sup> при злокачественных заболеваниях крови, таких как лимфома и лейкоз (1 - 4).

## 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 (NaN<sub>3</sub>), требуют осторожного обращения. Не проглатывайте, избегайте любого контакта с кожей, слизистой оболочкой и глазами.

В кислой среде азид натрия способен образовывать взрывоопасную азотисто-водородную 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 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).
- Изотипический контроль: IOTest 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. 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

В 1989 г. на Четвертом международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека в Вене, Австрия, было подтверждено, что моноклональные антитела (mAb) J4.119 направлены против CD19 (5).

## ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны положительные клетки линии RAMOS и отрицательные клетки линии HPBALL. Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных и отрицательных клеток изменялось от 0 до 100%. Клетки были окрашены в соответствии с описанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислилась линейная регрессия. Уравнение регрессии можно использовать для определения линейности и диапазона измерений.

Маркер	Линейная регрессия	Линейность (R <sup>2</sup> )	Диапазон (%)
CD19	$Y = 0.99 X + 0.59$	0.999	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 50 взрослых людей. В следующей таблице представлены результаты подсчета положительных событий:

Лимфоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD19+	50	10.80	5.72	52.96

## ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялось процентное содержание положительных клеток целевой популяции (лимфоцитов). Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD19+	12	13.30	0.57	4.3

## МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

### Цитометр # 1

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD19+	12	13.30	0.57	4.3

### Цитометр # 2

Положительные лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD19+	12	13.89	0.80	5.8

## ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном расположении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
- 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  $5 \times 10^9$ /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 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 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

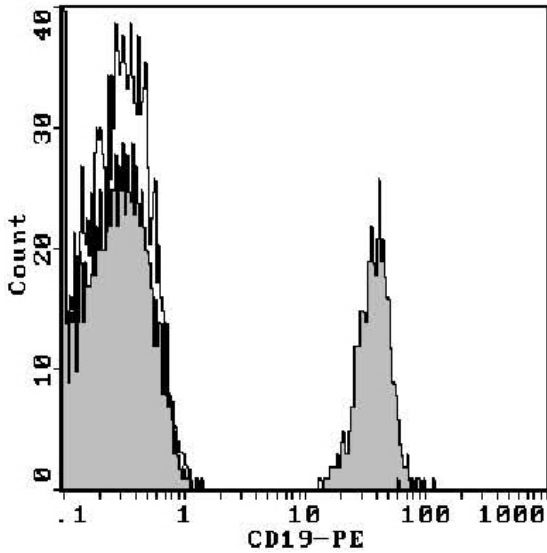
www.beckmancoulter.com



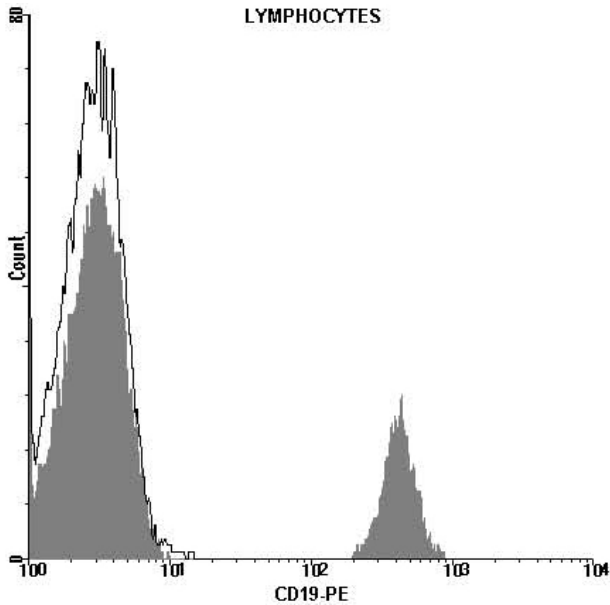
**ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ**

Ниже показаны однопараметровые гистограммы (количество клеток – интенсивность флуоресценции), полученные при анализе лизированного образца нормальной цельной крови. Для окрашивания использовались конъюгаты антител IOTest CD19-PE (кат. № A07769). Выполнялось выделение лимфоцитов программными средствами. Изотипический контроль - конъюгаты PE с мышиным IgG1 (кат. № A07796) показаны 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 Becton Dickinson FACScan™.



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Doody, G.M., Dempsey, P.W., Fearon, D.T., "Activation of B lymphocytes: integrating signals from CD19, CD22 and FcγRIIb1", 1996, *Cur. Opin. Immunol.*, 8, 378-382.
2. Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L., Tedder, T.F., "The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules", 1992, *J. Immunol.*, 9, 149, 2841-2850.
3. Carter, R.H., Doody, G.M., Bolen, J.B., Fearon, D.T., "Membrane IgM-induced tyrosine phosphorylation of CD19 requires a CD19 domain that mediates association with components of the B cell antigen receptor complex", 1997, *J. Immunol.*, 158, 3062-3069.
4. Tedder, T.F., Zhou, L.J., Engel, P., "The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes", 1994, *Immunol. Today*, 9, 15, 437-442.
5. Tedder, F., Isaacs, C.M., Penta, A., "Cloning and structure of CD19, a member of the immunoglobulin superfamily. Use of transfected cells to examine the workshop antibodies", 1989, *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 36-38.