

# IOTest® CD56-PE

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР A07788

100 тестов; 2 мл  
20 мкл / тест



IOTest  
Конъюгаты антител

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
IN VITRO



Спецификации	
Специфичность	CD56
Клон	N901 (NKH-1)
Гибридома	NS1/1-Ag4 x Balb/c
Иммуноген	Аномальные клетки, полученные от пациента, страдающего хроническим миелолейкозом
Иммуноглобулин	IgG1
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 <sub>3</sub>

## НАЗНАЧЕНИЕ

Данные конъюгированные с флуорохромом антитела позволяют идентифицировать лимфоциты, экспрессирующие антиген CD56, 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, отбраковавшей 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

Моноклональные антитела (mAb) N901 (или NKH-1) распознают антиген CD56, экспрессируемый большинством естественных киллеров (NK) в периферической крови (1, 2) и субпопуляцией циркулирующих (CD3+) Т-лимфоцитов (3).

ЕК свойственна специфическая цитотоксическая активность, которая проявляется при смещении равновесия между ингибиторными сигналами, получаемые рецепторами KIRs (Killer Immunoglobulin-like Receptors – Иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров), и активирующими сигналами, получаемые рецепторами NCR (Natural Cytotoxicity – Рецепторы естественной цитотоксичности). KIRs, распознавая достаточное количество молекул HLA-антигена I класса на поверхности клеток-мишеней, передают сигнал, способный ингибировать лизис. И наоборот, если молекул HLA-антигена недостаточно (на опухолевых или инфицированных вирусом клетках), сигнал к лизису, передаваемый NCRs, не ингибируется, что приводит к разрушению клеток-мишеней (4).

У здоровых людей более 95% клеток, способных индуцировать специфическую цитотоксическую

активность, это лимфоциты периферической крови. Они составляют 15% от всех лимфоцитов периферической крови и экспрессируют антиген NKH-1.

Данный реагент позволяет охарактеризовать и подсчитать NK-клетки и/или клетки с цитотоксической активностью с фенотипом CD56+. Также он позволяет исследовать популяции этих клеток при заболеваниях иммунной системы: СПИДе и других иммунодефицитных состояниях (2), аутоиммунных заболеваниях, реакциях гиперчувствительности, вирусных инфекциях, восстановлении иммунной системы после пересадки костного мозга и/или органов (5). Кроме того, реагент можно использовать для выполнения фенотипирования при злокачественных заболеваниях крови, таких как лимфома и лейкоз (6 – 10).

## 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 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 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 отмытки 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. Ресуспандируйте 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) N901 (NKH-1) направлены против CD56 (WS Code: NK59, Section NK) (11).

### ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были в различных пропорциях смешаны клетки линии M07E (CD56+) и периферическая кровь, разведенная в пропорции 1/5000 (CD56 – эритроциты). Общее количество клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение положительных клеток и эритроцитов изменялось от 0 до 100%.

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

Маркер	Линейная регрессия	Линейность (R <sup>2</sup> )	Диапазон (%)
CD56	$Y = 0.97 X + 0.22$	0.999	1 – 96

### 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 представлено среднее процентное содержание CD56+ лимфоцитов:

Лимфоциты	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD56+	50	17.2	6.3	36.6

### ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на одном цитометре определялось процентное содержание CD56+ лимфоцитов в крови донора. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

Лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD56+	12	21.4	1.4	6.5

### МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В один день на двух цитометрах двумя лаборантами определялось процентное содержание CD56+ лимфоцитов в крови донора. Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

#### Цитометр # 1

Лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD56+	12	21.4	1.4	6.5

#### Цитометр # 2

Лимфоциты	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD56+	12	19.6	0.6	3.2

### 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  $5 \times 10^9/л$ .
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, 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 CD56-PE (кат. № A07788). Выполнялось выделение лейкоцитов программными средствами. Изотипический контроль (кат. № A07796) на диаграммах не показывается.

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

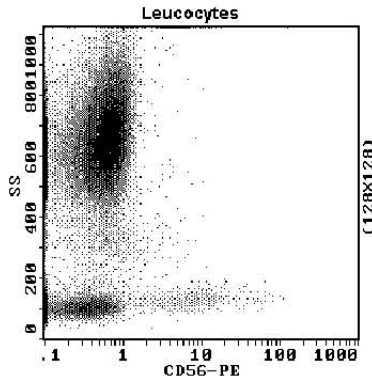
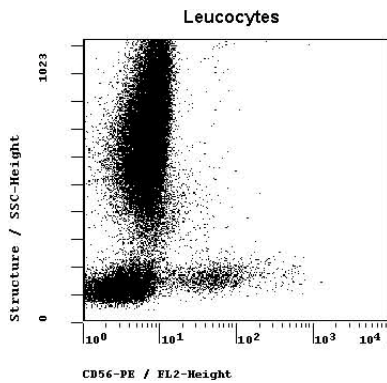


Диаграмма 2. Считывание данных выполнено с помощью проточного цитофлуориметра Vecton Dickinson FACScan™. Анализ выполнен в программном обеспечении EXPO™.



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Griffin, J.D., Hercend, T., Beveridge, R., Schlossman, S.F., "Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells", 1983, J. Immunol., 130, 2947-2951.
2. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., Phillips, J.H., "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes", 1986, J. Immunol., 136, 4480-4486.
3. Hercend, T., Griffin, J.D., Bensussan, A., Schmidt, R.E., Edson, M.A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F., Ritz, J., "Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone: Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes", 1985, J. Clin. Invest., 75, 932-943.
4. Whiteside, T.L., Herberman, R.B., "The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer", 1995, Curr. Opin. Immunol., 7, 704-710.
5. Lanier, L.L., "The role of natural killer cells in transplantation", 1995, Curr. Opin. Immunol., 7, 626-631.
6. Robertson, M.J., Ritz, J., "Biological and clinical relevance of human natural killer cells", 1990, Blood, 12, 76, 2421-2438.
7. 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.
8. Rothe, G., Schmitz, G., Adorf, D., Barlage, S., Gramatzki, M., Hanenberg, H., 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.
9. Rosenberg, S.A., "Classification of lymphoid neoplasms", 1994, Blood, 5, 84, 1359-1360.
10. 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.
11. Schubert, J., Lanier, L.L., Schmidt, R.E., "Cluster report: CD56", 1989, Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 699-702.