IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 tests ; 0.5 mL
10 µL / test

IOTest
Conjugated Antibody

IVD CE

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH 2
FRANÇAIS 4
DEUTSCH 6
ESPAÑOL 8
ΕΛΛΗΝΙΚΑ 10
ITALIANO 12
PORTUGUÊS 14
NORSK 16
SVENSKA 18
ČESKY 20
DANSK 22
MAGYAR 24
РУССКИЙ 26
TÜRKÇE 28
POLSKI 30
SLOVENSKY 32
България 34
HRVATSKI 36
LIETUVIŲ K. 38
LATVIEŠU 40
EESTI KEEL 42
SRPSKI 44
中文 46
日本語 48
한국어 50
APPENDIX 52

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 tests; 0.5 mL
10 µL / test

IOTest
Conjugated Antibody

IVD

CE

ENGLISH	Specifications
Specificity	CD11b
Clone	Bear1
Hybridoma	SP2/0 x balb/c
Immunogen	Purified human monocytes
Immunoglobulin	IgG1
Species	Mouse
Source	Ascites fluid or supernatant of in vitro cultured hybridoma cells
Purification	Affinity chromatography
Fluorochrome	Pacific Blue
Molar ratio	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ excitation	405 nm
Emission Peak	455 nm
Buffer	PBS pH 7.2 plus 2 mg / mL BSA and 0.1% NaN_3

USE
This fluorochrome-conjugated antibody allows the identification of cell populations expressing the CD11b antigen present in human peripheral blood using flow cytometry.

PRINCIPLE
This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by leucocytes.
Specific staining of the leucocytes is performed by incubating the sample with the IOTest reagent. The red cells are then removed by lysis and the leucocytes, which are unaffected by this process, are analyzed by flow cytometry. The flow cytometer measures light diffusion and the fluorescence of cells. It makes possible the delimitation of the population of interest within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the diffusion of narrow-angle light (Forward Scatter or FS). Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer can be used as supports in the gating stage depending on the application chosen by the user.

EXAMPLES OF CLINICAL APPLICATIONS
CD11b is useful for the detection and characterization of hematologic disorders (4-6). CD11b molecule is expressed in acute monoblastic leukaemia and acute monocytic leukaemia. Abnormalities of CD11b expression have prognostic significance in myelodysplastic syndromes (MDS). Patients with a low percentage of bone marrow cells expressing CD11b have a higher risk of evolution to acute myeloid leukemia compared to patients with more than 53% of marrow cells expressing CD11b (4). In addition, CD11b can sometimes be observed on T cell large granular lymphocyte leukemia (7).

STORAGE AND STABILITY
The conjugated liquid forms must be kept at between 2 and 8°C and protected from light, before and after the vial has been opened.
Stability of closed vial: see expiry date on vial.
Stability of opened vial: the reagent is stable for 180 days.

REAGENT CONTENTS
Concentration: See lot specific Certificate of Analysis at www.beckmancoulter.com.

EVIDENCE OF DETERIORATION
Any change in the physical appearance of the reagents may indicate deterioration and the reagent should not be used.
In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address :
immuno-techsup@beckmancoulter.com

PRECAUTIONS
1. Do not use the reagent beyond the expiry date.
2. Do not freeze.
3. Let it come to room temperature (18 – 25°C) before use.
4. Minimize exposure to light.
5. Avoid microbial contamination of the reagents, or false results may occur.
6. Antibody solutions containing sodium azide (NaN_3) should be handled with care. Do not take internally and avoid all contact with the skin, mucosa and eyes.
   Moreover, in an acid medium, sodium azide can form the potentially dangerous hydrazoic acid. If it needs to be disposed of, it is recommended that the reagent be diluted in a large volume of water before pouring it into the drainage system so as to avoid the accumulation of sodium azide in metal pipes and to prevent the risk of explosion.
7. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (in particular: the wearing of protective gloves, gowns and goggles).
8. Never pipet by mouth and avoid all contact of the samples with the skin, mucosa and eyes.
9. Blood tubes and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.
10. Reagents and waste should be eliminated according to local requirements.

SAMPLES
Venous blood must be taken using sterile tubes containing an EDTA salt as the anticoagulant.
The samples should be kept at room temperature (18 – 25°C) and not shaken. The samples should be homogenized by gentle agitation prior to taking the test sample.
The samples must be analyzed within 24 hours of venipuncture.

METHODOLOGY
NECESSARY MATERIAL NOT SUPPLIED
- Sampling tubes and material necessary for sampling.
- Automatic pipettes with disposable tips for 10, 100 and 500 µL.
- Plastic haemolysis tubes.
- Calibration beads:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Red cell lysis reagent with washing stage after lysis. For example: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leucocyte fixation reagent. For example : IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Mouse Isotypic control Pacific Blue: IOTest reagent (Ref. A74764).
- Buffer (PBS: 0.01 M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PROCEDURE
For each sample analyzed, in addition to the test tube, one control tube is recommended in which the cells are mixed in the presence of the isotypic control (Ref. A74764).

1. Add 10 µL of specific IOTest conjugated antibody to each test tube, and 10 µL of the isotypic control to each control tube.
2. Add 100 µL of the test sample to both tubes. Vortex the tubes gently.
3. Incubate for 15 to 20 minutes at room temperature (18 – 25°C), protected from light.
4. Then perform lysis of the red cells, by following the recommendations of the lysis reagent used.
   For example, if you wish to use VersaLyse (Ref. A09777), refer to the leaflet and follow preferably the procedure called "with concomitant fixation", which consists in adding 1 mL of the "Fix-and-Lyse" mixture prepared extemporaneously. Vortex immediately for one second and incubate for 10 minutes at room temperature, protected from light.
5. Centrifuge for 5 minutes at 150 x g at room temperature.
6. Remove the supernatant by aspiration.
7. Resuspend the cell pellet using 3 mL of PBS.
8. Repeat step 5.
9. Remove the supernatant by aspiration and resuspend the cell pellet using:
   – 0.5 mL of PBS plus 0.1% of formaldehyde if the preparations are to be kept less than 24 hours. (A 0.1% formaldehyde PBS can be obtained by diluting 12.5 µL of the IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) at its 10X concentration in 1 mL of PBS).
   – 0.5 mL of PBS without formaldehyde, if the preparations are to be analyzed within 2 hours.

NOTE: In all cases, keep the preparations between 2 and 8°C and protected from light.

PERFORMANCE
Performance data are obtained using the procedure described above on samples within 24 hours of venipuncture previously collected

on sterile tubes with EDTA salt as anticoagulant and stored at 18-25°C. Analysis is performed within 24 hours following immunostaining.

SPECIFICITY

CD11b antigen is also referred to under several other names i.e. alpha-M integrin chain, Mac-1, CR3, iC3bR, or Mo1 (8, 9). It is a type I integral transmembrane glycoprotein of 170 – 165 kDa under reducing / non reducing conditions, respectively. CD11b shows 19 potential N-glycosylation sites (8).

Expression of the CD11b chain on the cell surface requires the presence of the CD18 antigen (also known as beta2 integrin chain). These two subunits combine to create the CD11b/CD18 integrin, one of the 4 integrin heterodimers that can be built by the association of CD18 beta chain with 4 distinctive CD11 alpha chains. The CD11b/CD18 (αMβ2) integrin is also called Mac-1. The CD11b/CD18 integrin has broad ligand binding capabilities. It can recognize CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, complement component iC3b, fibrinogen, and LPS/LBP (complex of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein), among other ligands (8). Additionally, there is evidence of intra-membrane interactions of CD11b/CD18 with GPI-anchored surface molecules such as CD16 or CD14 (10). These interactions may account for transmembrane signaling and effector functions of GPI-linked membrane receptors. CD11b/CD18 is highly expressed on NK lymphocytes, neutrophils, monocytes and macrophages.

BEAR1 monoclonal antibody (9) was assigned to the CD11b during the 6th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens in Kobe, Japan, in 1996 (WS Code: A015, Section Adhesion Molecules) (8).

PRECISION

The percentage of staining of a positive target was determined using two whole blood samples, run in ten replicates, on the same day and using the same cytometer. The results obtained are summarized in the following table:

Positive Target	Number	Mean (%)		SD		CV (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Lymphocytes CD11b +	10	27.94	28.46	0.84	0.57	2.99	2.01
Monocytes CD11b +	10	99.55	96.02	0.25	0.73	0.25	0.76
Granulocytes CD11b +	10	99.99	99.99	0.01	0.01	0.01	0.01

LIMIT OF DETECTION

A study was conducted in accordance with CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1). The Limit of Detection (LOD) is the lowest concentration of analyte that can be consistently detected. Results obtained are summarized in the following table :

Positive Target	Limit of Detection
Lymphocytes CD11b +	2.0 Cells/ µL
Monocytes CD11b +	2.0 Cells/ µL
Granulocytes CD11b +	1.0 Cells/ µL

LIMITATIONS OF THE TECHNIQUE

1. Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned perfectly, if fluorescence leaks have not been correctly compensated for and if the regions have not been carefully positioned.
2. It is preferable to use a RBC lysis technique with a washing step as this reagent has not been optimized for "no wash" lysis techniques.
3. Accurate and reproducible results will be obtained as long as the procedures used are in accordance with the technical insert leaflet and compatible with good laboratory practices.
4. The conjugated antibody of this reagent is calibrated so as to offer the best specific signal/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the reagent volume/sample volume ratio in every test.
5. In the case of a hyperleucocytosis, dilute the blood in PBS so as to obtain a value of approximately 5 x 10^9 leucocytes/L (2).
6. In certain disease states, such as severe renal failure or haemoglobinopathies, lysis of red cells may be slow, incomplete or even impossible. In this case, it is recommended to isolate mononucleated cells using a density gradient (Ficoll, for example) prior to staining (3).

MISCELLANEOUS

See the Appendix for examples and references.

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios and VersaLyse are trademarks of Beckman Coulter, Inc., and registered with the USPTO.

Pacific Blue is a trademark of Molecular Probes, Inc.

MANUFACTURED BY :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Customer Services: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 tests ; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Anticorps Conjugué

IVD CE

FRANÇAIS	Spécifications
Spécificité	CD11b
Clone	Bear1
Hybridome	SP2/0 x balb/c
Immunogène	Purified human monocytes
Immunoglobuline	IgG1
Espèce	Souris
Source	Ascites ou liquide surnageant de cellules hybridomes cultivées in vitro
Purification	Chromatographie par affinité
Fluorochrome	Pacific Blue
Ratio Molaire	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ d'excitation	405 nm
Pic d'émission	455 nm
Tampon	PBS pH 7,2 additionné de 2 mg / mL BSA et de 0,1% NaN_3

UTILISATION
Cet anticorps conjugué au fluorochrome permet l'identification des populations de cellules exprimant l'antigène CD11b présent dans le sang périphérique humain en utilisant la cytométrie de flux.

PRINCIPE
Ce test repose sur la capacité d'anticorps monoclonaux spécifiques de se fixer sur des cellules leucocytaires par les déterminants antigéniques qu'elles expriment.
Le marquage spécifique des leucocytes est réalisé en incubant l'échantillon avec le réactif IOTest. Les érythrocytes sont ensuite éliminés par lyse et les leucocytes, non affectés par cette étape, sont analysés par cytométrie en flux.
Le cytomètre de flux mesure la diffusion de la lumière et la fluorescence des cellules. Il rend possible la délimitation de la population d'intérêt au sein de la fenêtre électronique définie sur un histogramme, qui met en corrélation la diffusion orthogonale de la lumière (Side Scatter ou SS) et la diffusion de la lumière en angle étroit (Forward Scatter ou FS). D'autres histogrammes combinant deux des différents paramètres disponibles sur le cytomètre peuvent être utilisés comme supports dans la phase de gating en fonction de l'application choisie par l'utilisateur.

EXEMPLES D'APPLICATIONS CLINIQUES
CD11b est utile pour la détection et la caractérisation des affections hématologiques (4-6). La molécule CD11b est exprimée dans la leucémie aiguë monoblastique et la leucémie aiguë monocytaire. Les anomalies d'expression de la molécule CD11b ont une signification pronostique dans les syndromes myélodysplasiques (MDS). Les patients présentant un faible pourcentage de cellules de moelle osseuse exprimant la molécule CD11b ont un risque plus élevé d'évolution de la leucémie myéloïde aiguë par rapport aux patients présentant plus de 53 % des cellules de moelle osseuse exprimant la molécule CD11b (4). En outre, la molécule CD11b peut parfois être observée dans les cas de leucémie à grands lymphocytes granuleux T (7).

CONSERVATION ET STABILITE
Les formes conjuguées liquides se conservent entre 2 et 8°C et à l'abri de la lumière, avant et après que le flacon ait été ouvert.
Stabilité du flacon fermé : voir la date de péremption sur le flacon.
Stabilité du flacon ouvert : le réactif est stable pendant 180 jours.

CONTENU DU RÉACTIF
Concentration : Voir le certificat d'analyse spécifique du lot sur www.beckmancoulter.com.

SIGNES DE DÉTÉRIORATION
Tout changement de l'apparence physique des réactifs peut indiquer une détérioration et le réactif ne doit pas être utilisé.
En cas de détérioration de l'emballage ou si les données obtenues indiquent certaines altérations des performances, veuillez contacter notre service Support Technique :
Tel : 04 91 17 27 27 Fax : 04 91 17 27 25
immuno-techsup@beckmancoulter.com

PRÉCAUTIONS
1. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption.
2. Ne pas congeler.
3. Laisser revenir le réactif à température ambiante (18 –25°C) avant utilisation.
4. Minimiser l'exposition à la lumière.
5. Eviter la contamination microbienne des réactifs ou des résultats erronés peuvent être observés.
6. Les solutions d'anticorps contenant de l'azoture de sodium (NaN_3) doivent être manipulées avec précaution. Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux.
   Par ailleurs, en milieu acide, l'azoture de sodium peut conduire à la formation d'un acide hydrazoïque potentiellement dangereux. Avant élimination, il est recommandé de diluer le réactif dans un grand volume d'eau avant de le verser dans le système de drainage afin d'éviter l'accumulation d'azoture de sodium dans les tubes métalliques et de prévenir le risque d'explosion.
7. Tous les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés avec soin (en particulier : port de gants, de blouses et de lunettes de protection).
8. Ne jamais pipetter avec la bouche et éviter tout contact des échantillons avec la peau, les muqueuses et les yeux.
9. Les tubes de prélèvement sanguin et les matériaux jetables utilisés pour la manipulation doivent être éliminés dans des conteneurs appropriés prévus pour incinération.
10. Les réactifs et les déchets doivent être éliminés conformément aux exigences locales.

ECHANTILLONS
Les prélèvements de sang veineux doivent s'effectuer sur tubes stériles contenant un sel d'EDTA comme anticoagulant
Les échantillons se conservent à température ambiante (18 – 25°C) et sans agitation. Les échantillons doivent être homogénéisés par agitation douce avant de prélever l'échantillon de test.
Les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures qui suivent la ponction veineuse.

MÉTHODOLOGIE
MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI
- Tubes à prélèvement et matériel nécessaire aux prélèvements.
- Pipettes automatiques avec embouts jetables pour 10, 100 et 500 µL.
- Tubes d'hémolyse en plastique.
- Billes de calibration :
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Réactif de lyse de globule rouge avec phase de lavage après lyse. Par exemple : VersaLyse (réf. A09777).
- Réactif de fixation leucocytaire. Par exemple : Solution de fixation IOTest 3 (réf. A07800).
- Contrôle isotypique Pacific Blue de Souris : réactif IOTest (Réf. A74764).
- Tampon (PBS : 0,01 M phosphate de sodium ; 0,145 M chlorure de sodium ; pH 7,2).
- Centrifugeuse.
- Agitateur automatique (type vortex).
- Cytomètre en flux.

PROCÉDURE
Pour chaque échantillon analysé, prévoir en plus du tube test, un tube contrôle dans lequel les cellules seront mises en présence du contrôle isotypique (réf. A74764).
1. Ajouter 10 µL d'anticorps conjugué spécifique IOTest à chaque tube test et 10 µL de contrôle isotypique dans chaque tube de contrôle.
2. Ajouter 100 µL de l'échantillon à tester dans les 2 tubes. Vortexer doucement.
3. Incuber pendant 15 à 20 minutes à température ambiante (18 - 25°C), à l'abri de la lumière.
4. Effectuer ensuite une lyse des érythrocytes, en suivant les recommandations du réactif de lyse utilisé.
   Par exemple, si vous souhaitez utiliser VersaLyse (réf. A09777), reportez-vous à la notice et suivez de préférence la procédure appelée « avec fixation concomitante », qui consiste à ajouter 1 mL du mélange « Fix-and-Lyse » préparé extemporanément. Vortexer immédiatement pendant une seconde et laisser incuber 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.
5. Centrifuger pendant 5 minutes à 150 x g à température ambiante.
6. Eliminer le surnageant par aspiration.
7. Remettre le culot cellulaire en suspension en utilisant 3 mL de PBS.
8. Répéter l'étape 5.

9. Éliminer le surnageant par aspiration et remettre le culot cellulaire en suspension en utilisant :

- 0,5 mL de PBS plus 0,1 % de formaldéhyde si les préparations sont destinées à être conservées moins de 24 heures. (Le PBS à 0,1 % de formaldéhyde peut être obtenu par dilution 12,5 µl de la solution de fixation IOTest 3 (réf. A07800) à sa concentration 10X dans 1 ml de PBS).
- 0,5 mL de PBS sans formaldéhyde, si les préparations doivent être analysées dans les 2 heures.

REMARQUE: Dans tous les cas, conservez les préparations entre 2 et 8°C et à l'abri de la lumière.

PERFORMANCE

Les données de performance sont obtenues suivant la procédure décrite précédemment sur des échantillons de sang de 24 heures au plus collectés auparavant dans des tubes stériles avec du sel d'EDTA comme anticoagulant et stockés à 18-25°C. L'analyse est effectuée dans les 24 heures suivant l'immunomarquage.

SPÉCIFICITÉ

L'antigène CD11b est également mentionné sous plusieurs autres noms tels que chaîne intégrine alpha-M, Mac-1, CR3, iC3bR ou Mo1 (8, 9). C'est une glycoprotéine transmembranaire intégrale de type I de 170 - 165 kDa respectivement sous conditions réductrices/non réductrices. L'antigène CD11b présente 19 sites potentiels de N-glycosylation (8).
L'expression de la chaîne CD11b à la surface de la cellule nécessite la présence de l'antigène CD18 (également connue comme chaîne intégrine bêta 2). Ces deux sous-unités se combinent pour créer l'intégrine CD11b/CD18, l'une des 4 intégrines hétérodimères pouvant être construites par l'association de la chaîne bêta CD18 avec 4 chaînes alpha CD11 distinctives. L'intégrine CD11b/CD18 (αMβ2) est également appelée Mac-1. L'intégrine CD11b/CD18 possède de larges capacités de liaison aux ligands. Elle peut reconnaître CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, le composant ic3b, le fibrinogène, le LPS/LBP (complexe de lipopolysaccharide (LPS) et protéine de liaison LPS), parmi d'autres ligands (8). En outre, il y a des preuves d'interactions intra-membranaires de CD11b/CD18 avec les molécules de surface ancrées au GPI telles que CD16 ou CD14 (10). Ces interactions peuvent tenir compte de la signalisation transmembranaire et des fonctions effectrices des récepteurs membranaires liés au GPI. CD11b/CD18 est fortement exprimé sur les lymphocytes NK, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages.
L'anticorps monoclonal BEAR1 (9) a été attribué au CD11b au cours du 6ème workshop HLDA sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains, tenu à Kobe, Japon, en 1996 (Code WS : A015, Section molécules d'adhérence) (8).

PRÉCISION

Le pourcentage de marquage d'une cible positive a été déterminé au moyen de deux échantillons de sang total, exécutés en dix réplicats, le même jour et en utilisant le même cytomètre. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Cible positive	Nombre	Moyenne (%)		SD		CV (%)	
		Donneur 1	Donneur 2	Donneur 1	Donneur 2	Donneur 1	Donneur 2
Lymphocytes CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocytes CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocytes CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

LIMITE DE DÉTECTION

Une étude a été menée conformément à CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). La limite de détection (LOD) est la plus faible concentration d'analyte qui peut être systématiquement détectée. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Cible positive	Limite de détection
Lymphocytes CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocytes CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocytes CD11b +	1,0 Cells/ µL

LIMITATIONS DE LA TECHNIQUE

1. La cytométrie en flux peut produire des résultats erronés si le cytomètre n'a pas été parfaitement aligné, si les fuites de fluorescence n'ont pas été correctement compensées et si les régions n'ont pas été soigneusement positionnées.
2. Il est préférable d'utiliser la technique de lyse des érythrocytes avec une phase de lavage car ce réactif n'a pas été optimisé pour les techniques de lyse sans lavage.
3. Des résultats précis et reproductibles sont obtenus tant que les procédures utilisées sont en conformité avec la notice technique et compatibles avec les bonnes pratiques de laboratoire.
4. L'anticorps conjugué est calibré de manière à obtenir le meilleur ratio de signal spécifique/signal non spécifique. Par conséquent, il est important de respecter le ratio volume de réactif/volume d'échantillon à chaque test.
5. Dans le cas de l'hyperleucocytose, diluer le sang dans du PBS afin d'obtenir une valeur d'environ 5 x 10^9 leucocytes/L (2).
6. Dans certains états pathologiques, telles qu'une grave insuffisance rénale ou une hémoglobinopathie, la lyse des érythrocytes peut être lente, incomplète ou même impossible. Dans ce cas, il est recommandé d'isoler les cellules mononucléées en utilisant un gradient de densité (Ficoll, par exemple) avant le marquage (3).

DIVERS

Voir l'annexe pour des exemples et des références.

MARQUES

Beckman Coulter, le logo stylisé, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios et VersaLyse sont des marques déposées de Beckman Coulter, Inc., et enregistrées auprès de l'USPTO.

Pacific Blue est une marque commerciale de Molecular Probes, Inc.

FABRIQUÉ PAR :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Service clientèle: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Tous droits réservés

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 Tests ; 0,5 mL
10 µL / Test

IOTest
Konjugierter Antikörper

IVD CE

DEUTSCH	Spezifikationen
Spezifität	CD11b
Klon	Bear1
Hybridom	SP2/0 x balb/c
Immunogen	Purified human monocytes
Immunglobulin	IgG1
Art	Maus
Quelle	Aszitesflüssigkeit oder Überstand der in-vitro kultivierten Hybridomzellen
Reinigung	Affinitätschromatographie
Fluorochrom	Pacific Blue
Molares Verhältnis	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
Anregungs-λ	405 nm
Emissionspeak	455 nm
Puffer	PBS pH 7,2 plus 2 mg / mL BSA und 0,1% NaN_3

ANWENDUNG
Mithilfe der Durchflusszytometrie ermöglicht dieser fluorochrom-konjugierte Antikörper die Identifizierung von Zellpopulationen, die das CD11b-Antigen im peripheren Humanblut exprimieren.

PRINZIP
Dieser Test basiert auf der Fähigkeit monoklonaler Antikörper, sich an antigene Determinanten zu binden, die von Leukozyten exprimiert werden.
Das spezifische Färben der Leukozyten wird durch Inkubation der Probe mit dem IOTest-Reagenz vorgenommen. Die Erythrozyten werden dann durch Lyse entfernt und die Leukozyten, die von diesem Prozess unberührt bleiben, werden mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert.
Das Durchflusszytometer misst die Lichtablenkung und die Fluoreszenz von Zellen. Es ermöglicht die Abgrenzung der gewünschten Population innerhalb des elektronischen Fensters, das in einem Histogramm definiert wird, welches die orthogonale Lichtstreuung (Seitwärtsstreuung) und die Streuung des tiefstrahlenden Lichts (Vorwärtsstreuung) in Beziehung zueinander setzt. Andere Histogramme, die zwei der verschiedenen Parameter kombinieren, die auf dem Zytometer verfügbar sind , können als Unterstützung beim Gating eingesetzt werden, je nachdem welche Anwendung der Benutzer ausgewählt hat.

BEISPIELE VON KLINISCHEN ANWENDUNGEN
CD11b ist nützlich bei der Erkennung und Charakterisierung von hämatologischen Störungen (4-6). Das CD11b-Molekül wir bei akuter Monoblastenleukämie und akuter Monozytenleukämie exprimiert. Anomalien der CD11b-Expression haben eine prognostische Bedeutung bei myelodysplastischen Syndromen (MDS). Bei Patienten mit einem geringen Prozentsatz von CD11b-exprimierenden Knochenmarkzellen ist das Risiko einer akuten myeloischen Leukämie im Vergleich zu Patienten mit mehr als 53 % an CD11b-exprimierenden Knochenmarkzellen höher (4). Zusätzlich kann CD11b bei T-LGL-Leukämie beobachtet werden (7).

LAGERUNG UND STABILITÄT
Die konjugierten Flüssigkeitsformen müssen vor und nach dem Öffnen des Fläschchens zwischen 2 und 8°C und lichtgeschützt gelagert werden.
Stabilität des geschlossenen Fläschchens: Siehe Ablaufdatum auf dem Fläschchen.
Stabilität des geöffneten Fläschchens: das Reagenz ist 180 Tage lang stabil.

REAGENZIENBESTANDTEILE
Konzentration: Angaben hierzu finden Sie im chargenspezifischen Analysezertifikat unter www.beckmancoulter.com.

VERFALLSANZEICHEN
Jegliche Veränderung des optischen Zustands der Reagenzien können ein Anzeichen für Verfall sein und das Reagenz sollte dann nicht mehr verwendet werden.
Wenn die Verpackung beschädigt ist oder die erhaltenen Daten irgendwelche Leistungsänderungen anzeigen, kontaktieren Sie Ihren lokalen Vertriebshändler oder wenden sich an folgende E-Mail-Adresse:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

VORSICHTSMASSNAHMEN
1. Das Reagenz nach Überschreiten des Ablaufdatums nicht mehr verwenden.
2. Nicht einfrieren.
3. Vor dem Gebrauch erst auf Zimmertemperatur (18 – 25°C) kommen lassen.
4. Von Licht fernhalten.
5. Mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien vermeiden, da dies falsche Ergebnisse zur Folge haben kann.
6. Antikörperlösungen, die Natriumazid (NaN_3) enthalten, vorsichtig handhaben. Nicht verschlucken und sämtlichen Kontakt mit Haut, Schleimhäuten und Augen vermeiden. In einem sauren Medium kann Natriumazid außerdem die potenziell gefährliche Stickstoffwasserstoffsäure bilden. Bei der Entsorgung ist darauf zu achten, dass das Reagenz mit einem großen Wasservolumen verdünnt wird, bevor es in das Abwassersystem geschüttet wird, um die Ansammlung von Natriumazid in Metallrohren und die Explosionsgefahr zu vermeiden.
7. Alle Blutproben müssen als potentiell infektiös angesehen und vorsichtig gehandhabt werden (d. h. vor allem: Tragen von Schutzhandschuhen, Laborkitteln und Schutzbrillen).
8. Niemals mit dem Mund pipettieren und sämtlichen Kontakt der Proben mit der Haut, den Schleimhäuten und den Augen vermeiden.
9. Benutzte Blutröhrchen und Einwegmaterialien sind in für die Verbrennung vorgesehene zweckentsprechende Behälter zu entsorgen.
10. Reagenzien und Abfall müssen entsprechend den lokalen Richtlinien entsorgt werden.

PROBEN
Venöses Blut muss mithilfe steriler Röhrchen entnommen werden, in denen ein EDTA-Salz als Antikoagulanz enthalten ist.
Die Proben sind bei Zimmertemperatur (18 – 25°C) zu lagern und sollten nicht geschüttelt werden. Die Proben sollten vor der Entnahme der Testprobe durch behutsames Rühren homogenisiert werden.
Die Proben müssen innerhalb von 24 Stunden nach der Venenpunktion analysiert werden.

METHODIK
BENÖTIGTES MATERIAL, NICHT MITGELIEFERT
- Probennahmeröhrchen und für die Probennahme benötigtes Material.
- Automatische Pipetten mit Einwegspitzen für 10, 100 und 500 µl.
- Kunststoff-Hämolyseröhrchen.
- Kalibrierpartikel:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Erythrozyten-Lysereagenz mit Waschstufe nach der Lyse. Zum Beispiel: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leukozyten-Fixierreagenz. Zum Beispiel: IOTest 3 Fixierlösung (Ref. A07800).
- Maus Isotypkontrolle Pacific Blue: IOTest-Reagenz (Ref. A74764).
- Puffer (PBS: 0,01 M Natriumphosphat; 0,145 M Natriumchlorid; pH 7,2).
- Zentrifuge.
- Automatisches Rührwerk (Vortexmischer).
- Durchflusszytometer.

VERFAHREN
Für jede analysierte Probe wird, zusätzlich zum Teströhrchen, ein Kontrollröhrchen empfohlen, in dem die Zellen in Gegenwart der Isotypkontrolle gemischt werden (Ref. A74764).

1. 10 µl des spezifischen, konjugierten IOTest-Antikörpers in jedes Teströhrchen und 10 µl der Isotypkontrolle in jedes Kontrollröhrchen geben.
2. 100 µl der Testprobe in beide Röhrchen hinzufügen. Die Röhrchen vorsichtig mischen.
3. 15 bis 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur (18 – 25°C) inkubieren.
4. Anschließend die Lyse der Erythrozyten gemäß den Empfehlungen für das verwendete Lysereagenz durchführen.
5. Wenn z. B. VersaLyse (Ref. A09777) verwendet werden soll, die Broschüre lesen und vorzugsweise das Verfahren „mit gleichzeitiger Fixierung" befolgen, bei dem 1 ml der vorbereiteten Rezepturmischung „Fix-and-Lyse" hinzugefügt wird. Das Röhrchen sofort

eine Sekunde lang mischen und 10 Minuten lang lichtgeschützt bei Zimmertemperatur inkubieren.
6. Fünf Minuten mit 150 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren.
7. Überstand durch Ansaugen entfernen.
8. Das Zell-Pellet mithilfe von 3 ml PBS resuspendieren.
   Schritt 5 wiederholen.
9. Den Überstand absaugen und das Zell-Pellet wie folgt resuspendieren:

- 0,5 ml PBS plus 0,1 % Formaldehyd , wenn die Präparate weniger als 24 Stunden aufbewahrt werden sollen. (Einen 0,1%-iger Formaldehyd-PBS-Resuspensionspuffer erhält man, durch Verdünnung von 12,5 µl der IOTest 3 Fixierlösung (Ref. A07800) in 10-facher Konzentration mit 1 ml PBS).
- 0,5 ml PBS ohne Formaldehyd, wenn die Präparate innerhalb von 2 Stunden analysiert werden sollen.

HINWEIS: Die Präparate sind in allen Fällen lichtgeschützt zwischen 2 und 8°C aufzubewahren.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsdaten erhält man mithilfe des oben beschriebenen Verfahrens zu Proben, die innerhalb von 24 Stunden nach der Venenpunktion in sterile Röhrchen gegeben werden, die ein EDTA-Salz als Antikoagulanz enthalten und bei 18-25°C gelagert werden. Die Analyse erfolgt innerhalb von 24 Stunden nach der Immunfärbung.

SPEZIFITÄT

Das CD11b-Antigen hat verschiedene andere Namen z. B. Alpha-M-Integrinkette, Mac-1, CR3, iC3bR oder Mo1 (8, 9). Es ist ein integrales Transmembran-Glykoprotein des Typs I mit 170 bzw. 165 kDa unter reduzierenden / nicht reduzierenden Bedingungen. CD11b zeigt 19 potenzielle N-Glykosylierungsstellen (8).
Eine Expression auf der CD11b-Kette an der Zelloberfläche erfordert das Vorhandensein des CD18-Antigens (auch bekannt als beta2-Integrinkette). Diese zwei Untereinheiten verbinden sich, um das CD11b/CD18-Integrin zu erstellen, eins der 4 Integrin-Heterodimeren, die durch den Zusammenschluss von CD18 beta-Ketten mit 4 distinktiven CD11 alpha-Ketten aufgebaut werden können. Das CD11b/CD18 (αMβ2) Integrin wird auch Mac-1 genannt. Das CD11b/CD18 Integrin hat eine stark ausgeprägte Ligandenbindungsfähigkeit. Es kann CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, Komplementkomponente iC3b, Fibrinogen, und LPS/LBP (Komplex aus Lipopolysacchariden (LPS) und LPS-Bindungsprotein) unter anderen Liganden erkennen (8). Es gibt außerdem Beweise für intramembranöse Interaktionen zwischen CD11b/CD18 und den über einen GPI-Anker gebundenen Oberflächenmolekülen wie CD16 oder CD14 (10). Diese Interaktionen können zur transmembranen Signalübertragung und zu Effektorfunktionen der GPI-gebundenen Membranrezeptoren beitragen. Bei NK-Lymphozyten, Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen wird CD11b/CD18 stark exprimiert.
Der monoklonale Antikörper BEAR1 (9) wurde auf dem 1996 in Kobe, Japan, abgehaltenen 6. HLDA (Human Leucocyte Differentiation Antigens)-Workshop (WS Code: A015, Abschnitt Adhäsionsmoleküle) dem CD11b zugeordnet (8).

PRÄZISION

Der Prozentsatz der Färbung eines positiven Ziels wurde anhand von zwei Vollblutproben bestimmt, mit denen am gleichen Tag und auf dem gleichen Zytometer zehn Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden. Die gewonnen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Positives Ziel	Referenz-nummer	Mittelw. (%)		SD		VK (%)	
		Spender 1	Spender 2	Spender 1	Spender 2	Spender 1	Spender 2
Lymphozyten CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monozyten CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulozyten CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

NACHWEISGRENZE

Gemäß CLSI-Richtlinie EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Die Nachweisgrenze (LOD) ist die niedrigste, kontinuierlich nachweisbare Konzentration des Analyten. Die gewonnen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Positives Ziel	Nachweisgrenze
Lymphozyten CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monozyten CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulozyten CD11b +	1,0 Cells/ µL

EINSCHRÄNKUNGEN DER TECHNIK

1. Die Durchflusszytometrie kann falsche Ergebnisse liefern, wenn das Zytometer nicht korrekt justiert, Fluoreszenzmittel-Leckagen nicht korrekt kompensiert und die Regionen nicht sorgfältig positioniert wurden.
2. Es ist ratsam eine ERY-Lysetechnik mit einem Waschschritt anzuwenden, da dieses Reagenz nicht für Lysetechniken mit „keine Reinigung“ optimiert wurde.
3. Solange die angewendeten Verfahren mit der technischen Broschüre und den „Guten Laborpraktiken“ übereinstimmen, erhalten Sie genaue und reproduzierbare Ergebnisse.
4. Der konjugierter Antikörper dieses Reagenzes wurde im Hinblick auf das bestmögliche Verhältnis von spezifischem Signal zu nicht spezifischem Signal kalibriert. Daher ist es wichtig, das Verhältnis von Reagenzvolumen zu Probenvolumen in jedem Test einzuhalten.
5. Im Falle einer Hyperleukozytose, verdünnen Sie das Blut in PBS, bis Sie einen Wert von ca. 5 x 10^9 Leukozyten/l erhalten (2).
6. Bei bestimmten Krankheitsbildern, wie beispielsweise schwerem Nierenversagen oder Hämoglobinopathien kann die Lyse der Erythrozyten langsam, unvollständig oder gar nicht ablaufen. In diesem Fall wird empfohlen, die mononukleären Zellen mithilfe eines Dichtegradienten (z. B. Ficoll) vor dem Färben zu isolieren (3).

VERSCHIEDENES

Im Anhang finden Sie Beispiele und Literaturhinweise.

MARKEN

Beckman Coulter, stilisierte Logo, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios und VersaLyse sind Marken von Beckman Coulter, Inc. und beim USPTO eingetragen.

Pacific Blue ist eine Marke von Molecular Probes, Inc.

HERGESTELLT VON :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Kundendienst: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Alle Rechte vorbehalten.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 determinaciones;
0,5 mL
10 µL / determinación

IOTest
Anticuerpo Conjugado

IVD CE

ESPAÑOL	Especificaciones
Especificidad	CD11b
Clon	Bear1
Hibridoma	SP2/0 x balb/c
Inmunógeno	Purified human monocytes
Inmunoglobulina	IgG1
Especie	Ratón
Origen	Líquido ascítico o sobrenadante de células de hibridoma cultivadas in vitro
Purificación	Cromatografía de afinidad
Fluorocromo	Pacific Blue
Relación molar	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ de excitación	405 nm
Pico de emisión	455 nm
Tampón	PBS pH 7,2 al que se le adicionan 2 mg / mL de BSA y 0,1% NaN_3

USO
Este anticuerpo conjugado con fluorocromo permite la identificación de las poblaciones celulares que expresan el antígeno CD11b presente en sangre periférica humana a través de citometría de flujo.

PRINCIPO
Esta prueba se basa en la capacidad de los anticuerpos monoclonales específicos de unirse a determinantes antigénicos expresados por leucocitos.
La tinción específica de los leucocitos se realiza incubando la muestra con el reactivo IOTest. Los hematíes se eliminan mediante lisis y los leucocitos (no afectados por este proceso) se analizan mediante citometría de flujo.
El citómetro del flujo mide la difusión de luz y la fluorescencia de las células. El citómetro permite delimitar la población de interés dentro de la ventana electrónica definida en un histograma, que correlaciona la difusión ortogonal de la luz (dispersión lateral o SS) y la difusión de la luz de ángulo estrecho (dispersión frontal o FS). Es posible utilizar otros histogramas que combinan dos de los diferentes parámetros disponibles en el citómetro como ayuda en la fase de selección (gating) según la aplicación seleccionada por el usuario.

EJEMPLOS DE APLICACIONES CLÍNICAS
El CD11b es útil para la detección y caracterización de trastornos hematológicos (4-6). La molécula CD11b es expresa en la leucemia monoblástica aguda y en leucemia monocítica aguda. Las anomalías en la expresión de CD11b tienen importancia pronóstica en los síndromes mielodisplásicos (MDS). Los pacientes con un bajo porcentaje de células de médula ósea que expresan el CD11b tienen un mayor riesgo de evolución a leucemia mieloide aguda en comparación con los pacientes con más de un 53% de células de médulas ósea que expresan el CD11b (4). Además, el CD11b puede observarse en ocasiones en la leucemia linfocítica granular de células grandes de linfocitos T (7).

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD
Las formas líquidas conjugadas deben mantenerse entre 2 y 8 °C y protegerse de la luz, antes y después de que se haya abierto el frasco.
Estabilidad del frasco cerrado: vea la fecha de caducidad en el frasco.
Estabilidad del frasco abierto: el reactivo es estable durante 180 días.

CONTENIDOS DEL REACTIVO
Concentración: Consulte el Certificado de análisis específico del lote en www.beckmancoulter.com.

SIGNOS DE DETERIORO
Cualquier cambio en el aspecto físico de estos reactivos pueden indicar un deterioro, y el reactivo no debe ser utilizado.
En caso de deterioro del paquete o si los datos obtenidos indican una alteración del rendimiento, póngase en contacto con su distribuidor local o escriba a la siguiente dirección de correo electrónico:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

PRECAUCIONES
1. No utilice el reactivo más allá de la fecha de caducidad.
2. No lo congele.
3. Deje que el reactivo se estabilice a temperatura ambiente (18 – 25 °C) antes del uso.
4. Reduzca al mínimo la exposición a la luz.
5. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados erróneos.
6. Las soluciones de anticuerpos que contienen azida sódica (NaN_3) deben manipularse con cuidado. No las ingiera y evite todo contacto con la piel, las mucosas y los ojos. Además, en presencia de un medio ácido, la azida sódica puede formar un ácido hidrazoico potencialmente peligroso. Si es necesario eliminar el reactivo, se recomienda diluirlo en un gran volumen de agua antes de verterlo en el sistema de desagüe con el fin de evitar la acumulación de azida sódica en las tuberías metálicas y para prevenir el riesgo de explosión.
7. Todas las muestras de sangre deben considerarse como potencialmente infecciosas y deben manipularse con cuidado (se recomienda llevar guantes, bata y gafas protectoras).
8. Nunca pipetee con la boca y evite el contacto de muestras con la piel, las mucosas y los ojos.
9. Los tubos sanguíneos y el material desechable utilizado para la manipulación debe desecharse en recipientes específicos para incineración.
10. Los reactivos y desechos deben eliminarse según los requisitos locales

MUESTRAS
La sangre venosa debe extraerse en tubos estériles que contengan una sal de EDTA como anticoagulante.
Las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente (18-25 º C) y no deben agitarse. Las muestras se deben homogeneizar mediante agitación suave antes de tomar la muestra de análisis.
Todas las muestras deben analizarse en un períodos de 24 horas desde la venipunción.

METODOLOGÍA
NO SE SUMINISTRA MATERIAL NECESARIO.
- Tubos de muestras y material necesario para el muestreo.
- Pipetas automáticas con puntas desechables para 10, 100 y 500 µL.
- Tubos de hemólisis de plástico.
- Microesferas de calibración
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Reactivo de lisis de hematíes con fase de lavado después de la lisis. Por ejemplo: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reactivo de fijación leucocitaria. Por ejemplo : Solución de fijación IOTest 3 (Ref. A07800).
- Ratón Control isotípico Pacific Blue: reactivo IOTest (Ref. A74764).
- Tampón (PBS: 0,01 M fosfato sódico; 0,145 M cloruro sódico ; pH 7,2).
- Centrífuga.
- Agitador automático (tipo vórtex)
- Citómetro de flujo.

PROCEDIMIENTO
Para cada muestra analizada, además del tubo de ensayo se recomienda utilizar un tubo de control en los que las células se mezclan en presencia de los controles isotípicos (Ref. A74764).

1. Añada 10 µL de anticuerpo conjugado IOTest específico a cada tubo de ensayo y 10 µL del control isotípico a cada tubo de control.
2. Añada 100 µL de la muestra de análisis a los dos tubos. Agite suavemente los tubos con vórtex.
3. Incube durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente 18 – 25°C), y proteja de la luz.
4. A continuación realice la lisis de los hematíes según las recomendaciones del reactivo de lisis utilizado.
   Por ejemplo, si desea utilizar VersaLyse (Ref. A09777), consulte la ficha técnica y seguir preferiblemente el procedimiento denominado "con fijación concomitante" que consiste en agregar 1 mL de la mezcla de "fijación y lisis" preparada extemporáneamente. Agite inmediatamente con vórtex durante un segundo e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.

5. Centrifugue durante 5 minutos a 150 x g a temperatura ambiente.
6. Elimine el sobrenadante mediante aspiración.
7. Resuspenda el sedimento celular en 3 mL de PBS.
8. Repita el paso 5.
9. Retire el sobrenadante mediante aspiración y resuspenda el sedimento utilizar con

- 0,5 mL de PBS más 0,1% de formaldehído si las preparaciones deben mantenerse menos de 24 horas. (Para obtener un PBS con 0,1 % de formaldehído, diluya 12,5 µL de la solución de fijación IOTest 3 (Ref. A07800) a su concentración 10X en 1 mL de BS).
- 0,5 mL de PBS sin formaldehído, si las preparaciones van a analizarse en menos de 2 horas.

NOTA: en todos los casos, mantenga las preparaciones entre 2 y 8 °C y proteja de la luz.

RENDIMIENTO

Los datos de rendimiento se obtuvieron a través del procedimiento descrito anteriormente en muestras analizadas dentro de las 24 horas posteriores a la venipunción y recogidas en tubos estériles con anticoagulante de sal de EDTA y almacenadas entre 18 y 25 °C. El análisis se realiza dentro de las 24 horas posteriores a la inmunotinción.

ESPECIFIDAD

El antígeno CD11b también se conoce por otros nombres, por ejemplo cadena alfa M de la integrina, Mac-1, CR3, iC3bR, o Mo1 (8, 9). Es un tipo de glicoproteína transmembrana integral de 170 – 165 kDa bajo condiciiones de reucción / no reducción respectivamente. El CD11b muestra 19 posibles sitios de glicosilación N (8).
La expresión de la cadena CD11b en la superficie celular requiere la presencia del antígeno CD18 (también conocida como cadena beta2 de la integrina). Estas dos subunidades se combinan para formar la integrina CD11b/CD18, uno de los cuatro heterodímeros de integrina que se pueden formar mediante la asociación de la cadena beta CD18 con cuatro cadenas CD11 alfa distintivas. La integrina CD11b/CD18 (αMβ2) también se denomina Mac-1. La integrina CD11b/CD18 tiene una gran capacidad de unión de ligandos. Puede reconocer el CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, el componente de complemento iC3b, fibrinógeno y LPS/LBP (complejo de lipopolisacáridos (LPS) y proteína de unción a LPS), entre otros ligandos (8). Además, hay pruebas de interacciones intramembrana del CD11b/CD18 con moléculas de la superficie ancladas a GPI tales como CD16 o CD14 (10). Estas interacciones pueden ser responsables de la señalización transmembrana y funciones efectoras de los receptores de membrana unidos a GPI. El CD11b/CD18 se expresa de forma importante en los linfocitos citolíticos naturales, neutrófilos, monocitos y macrófagos. El anticuerpo monoclonal BEAR1 (9) se asignó al CD11b durante el 6º Taller HLDA de Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos celebrado en Kobe, Japón, en 1996 (Código WS: A015, Sección de moléculas de adhesión) (8).

PRECISIÓN

El porcentaje de tinción de una muestra positiva se determinó con dos muestras de sangre completa procesada en diez repeticiones el mismo día y utilizando el mismo citómetro. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente:

Muestra positiva	Número	Media (%)		DE		CV (%)	
		Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2	Donante 1	Donante 2
Linfocitos CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocitos CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocitos CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

LÍMITE DE DETECCIÓN

El estudio se realizó de conformidad con CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)) El límite de detección (LOD) es la concentración más baja de analito que puede detectarse sistemáticamente. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente:

Muestra positiva	Límite de detección
Linfocitos CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocitos CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocitos CD11b +	1,0 Cells/ µL

LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

1. La citometría de flujo puede producir resultados falsos si el citómetro no se ha alineado perfectamente, si las fluorescencias no se han compensado correctamente y si las regiones no se han situado cuidadosamente.
2. Es preferible utilizar una técnica de lisis de hematíes con una etapa de lavado, ya que este reactivo no ha sido optimizado para técnicas de lisis "sin lavado".
3. Se obtendrán resultados exactos y reproducibles siempre que los procedimientos que se utilicen estén en conformidad con la ficha técnica suministrada y las prácticas adecuadas de laboratorio.
4. El anticuerpo conjugado de este reactivo se ha calibrado para ofrecer la mejor relación señal específica/señal inespecífica. Por lo tanto, es importante cumplir la relación volumen de reactivo / volumen de la muestra en cada análisis.
5. En el caso de la hiperleucocitosis, diluya la sangre en PBS para obtener un valor de aproximadamente. 5 x 10^9 leucocitos/L (2).
6. En algunos estados de enfermedad, por ejemplo con insuficiencia renal o hemoglobinopatías, la lisis de los hematíes puede ser lenta, incompleta o incluso imposible. En este caso, se recomienda aislar las células mononucleares utilizando un gradiente de densidad (Ficoll, por ejemplo) antes de la tinción (3).

VARIOS

Consulte el Anexo para ejemplos y referencias.

MARCAS COMERCIALES

Beckman Coulter, el logotipo estilizado, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios y VersaLyse son marcas comerciales de Beckman Coulter, Inc., y están registradas en la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos (USPTO).

Pacific Blue es una marca comercial de Molecular Probes, Inc.

FABRICADO POR :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Servicios al cliente: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014Beckman Coulter, Inc.
Todos los derechos reservados.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 δοκιμασίες, 0,5 mL
10 µL / δοκιμασία

IOTest
Συζευγμένο Αντίσωμα

IVD CE

ΕΛΛΗΝΙΚΑ	Χαρακτηριστικά
Εξειδίκευση	CD11b
Κλώνος	Bear1
Υβρίδωμα	SP2/0 x balb/c
Ανοσογόνο	Purified human monocytes
Ανοσοσφαιρίνη	IgG1
Είδος	Ποντικός
Πηγή	Υγρό ασκίτη ή υπερκείμενο των in vitro καλλιεργημένων υβδριδωματικών κυττάρων
Καθαρισμός	Χρωματογραφία συγγένειας
Φθοριόχρωμα	Pacific Blue
Γραμμομοριακή αναλογία	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ διέγερσης	405 nm
Κορυφή εκπομπής	455 nm
Ρυθμιστικό διάλυμα	PBS pH 7,2 εμπλουτισμένο με 2 mg / mL BSA και 0,1% NaN_3

ΧΡΗΣΗ
Αυτό το συζευγμένο με φθοροχρώμια αντίσωμα επιτρέπει την αναγνώριση κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν το αντιγόνο CD11b που υπάρχει στο ανθρώπινο περιφερικό αίμα με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής.

ΑΡΧΗ
Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην ικανότητα ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων να δεσμεύονται σε αντιγονικούς καθοριστές που εκφράζονται από λευκά αιμοσφαίρια.
Η ειδική χρώση των λευκών αιμοσφαιρίων πραγματοποιείται με την επώαση του δείγματος με το αντιδραστήριο IOTest. Κατόπιν τα ερυθρά κύτταρα απομακρύνονται με λύση, και τα λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία παραμένουν ανεπηρέαστα από αυτή τη διαδικασία, αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.
Η κυτταρομετρία ροής μετράει τη διάχυση φωτός και το φθορισμό των κυττάρων. Καθιστά δυνατό τον καθορισμό του πληθυσμού ενδιαφέροντος εντός του ηλεκτρονικού παραθύρου που ορίζεται σε ένα ιστόγραμμα, το οποίο συσχετίζει την ορθογώνια διάχυση του φωτός (Πλάγια σκέδαση ή SS - Side Scatter) και τη διάχυση φωτός υπό κλειστή γωνία (Πρόσθια σκέδαση ή FS - Forward Scatter). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα ιστογράμματα που συνδυάζουν δύο διαφορετικές παραμέτρους που διατίθεται στο κυτταρομετρητή όπως υποστηρίζεται στο στάδιο περίφραξης ανάλογα με την εφαρμογή που έχει επιλεγεί από τον χρήστη.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
Το CD11b είναι χρήσιμο για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό αιματολογικών διαταραχών (4-6). Το μόριο CD11b εκφράζεται στην οξεία μονοβλαστική λευχαιμία και στην οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία. Ανωμαλίες στην έκφραση του CD11b έχουν προγνωστική σημασία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ). Οι ασθενείς με χαμηλό ποσοστό κυττάρων του μυελού των οστών που εκφράζουν CD11b διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελοειδή λευχαιμία σε σύγκριση με τους ασθενείς στους οποίους πάνω από το 53% των κυττάρων του μυελού εκφράζουν CD11b (4). Επιπλέον, μερικές φορές το CD11b μπορεί να παρατηρηθεί στη λευχαιμία των μεγάλων κοκκιωδών Τ λεμφοκυττάρων (7).

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ
Οι συζευγμένες υγρές μορφές πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία μεταξύ 2 και 8°C και να προστατεύονται από το φως, πριν και μετά το άνοιγμα του φιαλιδίου.
Σταθερότητα κλειστού φιαλιδίου: βλ. ημερομηνία λήξης στο φιαλίδιο.
Σταθερότητα ανοιγμένου φιαλιδίου: το αντιδραστήριο είναι σταθερό για 180 ημέρες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ
Συγκέντρωση: Βλ. το Πιστοποιητικό ανάλυσης ειδικό της παρτίδας στη διεύθυνση www.beckmancoulter.com.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ
Οποιαδήποτε αλλαγή στη φυσική εμφάνιση των αντιδραστηρίων ενδέχεται να υποδεικνύει αλλοίωση και το αντιδραστήριο δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί.
Σε περίπτωση αλλοίωσης της συσκευασίας ή εάν τα δεδομένα που λήφθηκαν παρουσιάζουν κάποια αλλοίωση της απόδοσης, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα ή χρησιμοποιήστε την ακόλουθη διεύθυνση e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ
1. Μην χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης.
2. Μην καταψύχετε.
3. Αφήστε το να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου (18 – 25°C) πριν από τη χρήση.
4. Ελαχιστοποιήστε την έκθεση στο φως.
5. Αποφύγετε τυχόν μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων επειδή ενδέχεται να ληφθούν εσφαλμένα αποτελέσματα.
6. Ο χειρισμός των διαλυμάτων αντισωμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου (NaN_3) πρέπει να γίνεται με προσοχή. Μην το καταπίνετε και αποφεύγετε κάθε επαφή με το δέρμα, το βλεννογόνο και τους οφθαλμούς.
   Επιπλέον, σε όξινο μέσο, το αζίδιο του νατρίου μπορεί να σχηματίσει δυνητικά επικίνδυνο υδραζοϊκό οξύ. Εάν πρέπει να απορριφθεί, συνιστάται το αντιδραστήριο να αραιωθεί σε μεγάλο όγκο νερού πριν το αδειάσετε στο σύστημα αποχέτευσης για την αποφυγή συσσώρευσης αζιδίου του νατρίου σε μεταλλικούς σωλήνες και την αποφυγή του κινδύνου έκρηξης.
7. Όλα τα δείγματα αίματος πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά μολυσματικά και ο χειρισμός τους πρέπει να γίνεται με προσοχή (συγκεκριμένα: χρήση προστατευτικών γαντιών, προστατευτικής ρόμπας και προστατευτικών γυαλιών).
8. Ποτέ μην χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα και να αποφεύγετε κάθε επαφή με το δέρμα, το βλεννογόνο και τους οφθαλμούς.
9. Τα σωληνάρια αίματος και τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιούνται για το χειρισμό πρέπει να απορρίπτονται σε περιέκτες ad hoc που προορίζονται για αποτέφρωση.
10. Τα αντιδραστήρια και τα απόβλητα πρέπει να εξαλείφονται σύμφωνα με τις τοπικές απαιτήσεις.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ
Η λήψη φλεβικού αίματος πρέπει να πραγματοποιείται με τη χρήση αποστειρωμένων σωληναρίων που περιέχουν άλας EDTA ως αντιπηκτικό.
Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (18 – 25°C) και δεν πρέπει να ανακινούνται. Τα δείγματα πρέπει να ομογενοποιούνται με απαλή ανάδευση πριν από τη λήψη του δείγματος της εξέτασης.
Τα δείγματα πρέπει να αναλύονται εντός 24 ωρών από τη φλεβοπαρακέντηση.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ
ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ
- Σωληνάρια δειγματοληψίας και υλικά που απαιτούνται για τη δειγματοληψία.
- Αυτόματες πιπέτες με αναλώσιμα ρύγχη για 10, 100 και 500 µL.
- Πλαστικά σωληνάρια αιμόλυσης.
- Σφαιρίδια βαθμονόμησης:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Αντιδραστήριο λύσης ερυθρών κυττάρων με στάδιο έκπλυσης μετά τη λύση. Για παράδειγμα: VersaLyse (Κωδικός είδους A09777).
- Στερεωτικό αντιδραστήριο λευκών αιμοσφαιρίων. Για παράδειγμα: Στερεωτικό διάλυμα IOTest 3 Fixative Solution, (Κωδικός είδους A07800).
- Ποντικός Ισοτυπικός Έλεγχος Pacific Blue: αντιδραστήριο IOTest (Κωδ. A74764).
- Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS: 0,01 M φωσφορικό νάτριο, 0,145 M χλωριούχο νάτριο, pH 7,2).
- Φυγοκεντρική συσκευή.
- Αυτόματος αναδευτήρας (τύπου Vortex).
- Κυτταρομετρητής ροής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
Για κάθε δείγμα που αναλύεται, εκτός από το δοκιμαστικό σωληνάριο, συνιστάται και ένα σωληνάριο μάρτυρα στο οποίο τα κύτταρα θα αναμιγνύονται παρουσία του ισοτυπικού μάρτυρα (Κωδικός είδους A74764).

1. Προσθέστε 10 µL ειδικού συζευγμένου αντισώματος IOTest σε κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο και 10 µL του ισοτυπικού μάρτυρα σε κάθε σωληνάριο μάρτυρα.
2. Προσθέστε 100 µL του δείγματος της εξέτασης και στα δύο σωληνάρια. Αναδεύστε απαλά τα σωληνάρια σε συσκευή Vortex.

3. Επωάστε για 15 έως 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18 – 25°C), προστατεύοντας από το φως.
4. Κατόπιν, ακολουθήστε τις συστάσεις του αντιδραστηρίου λύσης που χρησιμοποιείται για να πραγματοποιήσετε λύση των ερυθρών κυττάρων.
   Για παράδειγμα, εάν θέλετε να χρησιμοποιήσετε το VersaLyse (Κωδικός είδους A09777), ανατρέξτε στο φυλλάδιο και ακολουθήστε, κατά προτίμηση, τη διαδικασία που καλείται «με ταυτόχρονη στερέωση», η οποία αποτελείται από την προσθήκη 1 mL του μίγματος «Fix-and-Lyse» το οποίο έχει προετοιμαστεί αυτοσχεδίως. Αναδεύστε αμέσως σε συσκευή Vortex για ένα δευτερόλεπτο και επωάστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατεύοντας από το φως.
5. Φυγοκεντρήστε για 5 λεπτά σε 150 x g σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Αφαιρέστε την υπερκείμενη στοιβάδα με αναρρόφηση.
7. Εκτελέστε επαναιώρηση του τμήματος του κυτταρικού ιζήματος χρησιμοποιώντας 3 mL διαλύματος PBS.
8. Επαναλάβετε το βήμα 5.
9. Αφαιρέστε το υπερκείμενο με αναρρόφηση και εκτελέστε επαναιώρηση του τμήματος του κυτταρικού ιζήματος χρησιμοποιώντας:

- 0,5 mL PBS καθώς και 0,1% φορμαλδεΰδη εάν πρόκειται να φυλάξτε τα παρασκευάσματα για λιγότερες από 24 ώρες. (Μπορεί να ληφθεί PBS με 0,1% φορμαλδεΰδη αραιώνοντας 12,5 µL του στερεωτικού διαλύματος IOTest 3 Fixative Solution (Κωδικός είδους. A07800) στη συγκέντρωση 10X σε 1 mL PBS).
- 0,5 mL PBS χωρίς φορμαλδεΰδη, εάν τα παρασκευάσματα πρόκειται να αναλυθούν εντός 2 ωρών.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Σε κάθε περίπτωση, φυλάξτε τα παρασκευάσματα σε θερμοκρασία μεταξύ 2 και 8°C και προστατευμένα από το φως.

ΑΠΟΔΟΣΗ

Τα δεδομένα απόδοσης λαμβάνονται με τη χρήση της διαδικασίας που περιγράφεται ανωτέρω, εντός 24 ωρών από τη φλεβοπαρακέντηση, σε δείγματα που συλλέχθηκαν προηγουμένως σε αποστειρωμένα σωληνάρια με άλας EDTA ως αντιπηκτικό και αποθηκεύτηκαν στους 18-25°C. Η ανάλυση πραγματοποιείται εντός 24 ωρών μετά την ανοσοχρώση.

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Το αντιγόνο CD11b είναι γνωστό και με ορισμένες άλλες ονομασίες, δηλ. άλφα-Μ αλυσίδα ιντεγκρίνης, Mac-1, CR3, iC3bR ή Mo1 (8, 9). Είναι μια ενσωματωμένη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι με μοριακό βάρος 170 – 165 kDa κάτω από αναγωγικές / μη αναγωγικές συνθήκες, αντίστοιχα. Το CD11b εμφανίζει 19 δυνητικές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης (8).
Η έκφραση της αλυσίδας CD11b στην κυτταρική επιφάνεια απαιτεί την παρουσία του αντιγόνου CD18 (γνωστό και ως αλυσίδα ιντεγκρίνης β2). Αυτές οι δύο υπομονάδες συνδυάζονται για τη δημιουργία της ιντεγκρίνης CD11b/CD18, μία από τα 4 ετεροδιμερή ιντεγκρίνης που μπορούν να δημιουργηθούν από το συνδυασμό της αλυσίδας CD18β με 4 διακριτές αλυσίδες CD11α. Η ιντεγκρίνη CD11b/CD18 (αMβ2) καλείται επίσης Mac-1. Η ιντεγκρίνη CD11b/CD18 διαθέτει ευρείες δυνατότητες πρόσδεσης του συνδέτη. Μπορεί να αναγνωρίσει CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, συστατικό συμπληρώματος iC3b, ινωδογόνο και LPS/LBP (σύμπλεγμα λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και πρωτεΐνης δέσμευσης του LPS), μεταξύ άλλων συνδετών (8). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ενδομεμβρανικών αλληλεπιδράσεων του CD11b/CD18 με επιφανειακά μόρια προσκολλημένα μέσω GPI όπως το CD16 ή το CD14 (10). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ενδεχομένως να είναι υπεύθυνες για τη διαμεμβρανική σήμανση και τις λειτουργίες του δραστικού τμήματος των μεμβρανικών υποδοχέων που είναι προσκολλημένοι μέσω GPI. Το CD11b/CD18 εκφράζεται έντονα σε φυσικά κυτταροκτόνα λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα.
Το μονοκλωνικό αντίσωμα BEAR1 (9) εκχωρήθηκε στο CD11b κατά το 6ο Εργαστήριο HLDA για τα αντιγόνα διαφοροποίησης των ανθρώπινων λευκών αιμοσφαιρίων στο Κόμπε, Ιαπωνία, το 1996 (Κωδικός WS: A015, Ενότητα Μόρια προσκόλλησης) (8).

ΟΡΘΟΤΗΤΑ

Το ποσοστό χρώσης ενός θετικού στόχου καθορίστηκε με τη χρήση δύο δειγμάτων ολικού αίματος, που αναλύθηκαν σε δέκα επαναλήψεις, την ίδια ημέρα και με τη χρήση του ίδιου κυτταρομετρητή.
Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Θετικός στόχος	Αριθμός	Μέση τιμή (%)		SD		CV (%)	
		Δότης 1	Δότης 2	Δότης 1	Δότης 2	Δότης 1	Δότης 2
Λεμφοκύτταρα CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Μονοκύτταρα CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Κοκκιοκύτταρα CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Διεξήχθη μια μελέτη με βάση τις οδηγίες του CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Το Όριο ανίχνευσης (LOD) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας που μπορεί να ανιχνευτεί με συνέπεια. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Θετικός στόχος	Όριο ανίχνευσης
Λεμφοκύτταρα CD11b +	2,0 Cells/ µL
Μονοκύτταρα CD11b +	2,0 Cells/ µL
Κοκκιοκύτταρα CD11b +	1,0 Cells/ µL

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να παράγει λανθασμένα αποτελέσματα εάν ο κυτταρομετρητής δεν έχει ευθυγραμμιστεί σωστά, εάν δεν έχει γίνει σωστή αντιστάθμιση για τις διαρροές φθορισμού και εάν οι περιοχές δεν έχουν τοποθετηθεί προσεκτικά.
2. Είναι προτιμότερη η χρήση μιας τεχνικής λύσης ερυθρών κυττάρων με βήμα έκπλυσης επειδή αυτό το αντιδραστήριο δεν έχει βελτιστοποιηθεί για τεχνικές λύσης «χωρίς έκπλυση».
3. Η λήψη των αποτελεσμάτων θα πραγματοποιείται με ακρίβεια και επαναληπτικότητα εάν οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνες με το τεχνικό ένθετο φυλλάδιο και συμβατές με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
4. Το συζευγμένο αντίσωμα αυτού του αντιδραστηρίου είναι βαθμονομημένο για να παράσχει το βέλτιστο λόγο ειδικού σήματος/μη ειδικού σήματος. Επομένως, είναι σημαντικό να τηρείτε το λόγο όγκου αντιδραστηρίου/όγκου δείγματος σε κάθε εξέταση.
5. Στην περίπτωση υπερλευκοκυτάρωσης, αραιώστε το αίμα σε PBS για να λάβετε μια τιμή 5 x 10^9 λευκοκύτταρα/L κατά προσέγγιση (2).
6. Σε ορισμένες ασθένειες, όπως σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια ή αιμοασφαιρινοπάθειες, η λύση των ερυθρών κυττάρων ενδεχομένως να είναι αργή, ατελής ή ακόμη να μην είναι δυνατή. Σε αυτή την περίπτωση, συνιστάται να απομονώσετε μονοπύρηνα κύτταρα με τη χρήση μέσου διαχωρισμού που βασίζεται στη μεταβολή πυκνότητας (Ficoll, για παράδειγμα) πριν από τη χρώση (3).

ΔΙΑΦΟΡΑ

Βλ. το Παράρτημα για παραδείγματα και παραπομπές.

ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ

Η ονομασία Beckman Coulter, το σύμβολο του λογότυπου, τα Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios και VersaLyse είναι εμπορικά σήματα της Beckman Coulter, Inc., και έχουν καταχωρηθεί στο Γραφείο Ευρεσιτεχνιών και Εμπορικών Σημάτων των Ηνωμένων Πολιτειών (USPTO).

Η ονομασία Pacific Blue είναι εμπορικό σήμα της Molecular Probes, Inc.

ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΖΕΤΑΙ ΑΠΌ:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Εξυπηρέτηση πελατών: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Με επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 test; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Anticorpo Coniugato

IVD CE

ITALIANO	Caratteristiche
Specificità	CD11b
Clone	Bear1
Ibridoma	SP2/0 x balb/c
Immunogeno	Purified human monocytes
Immunoglobulina	IgG1
Specie	Topo
Fonte	Fluido ascite o surnatante di cellule ibridoma coltivate in vitro
Purificazione	Cromatografia di affinità
Fluorocromo	Pacific Blue
Rapporto molare	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ d'eccitazione	405 nm
Picco d'emissione	455 nm
Tampone	PBS pH 7,2 addizionato con 2 mg / mL di BSA e lo 0,1% di NaN_3

USO
Questo anticorpo coniugato con fluorocromo consente l'identificazione di popolazioni cellulari che esprimono l'antigene CD11b presente nel sangue periferico umano mediante citometria a flusso.

PRINCIPI
Questo test si basa sulla capacità di anticorpi monoclonali specifici di legarsi ai determinanti antigenici espressi dai leucociti.
La colorazione specifica dei leucociti è eseguita incubando il campione con il reagente IOTest. Gli eritrociti sono quindi rimossi tramite lisi e i leucociti, non interessati da questo processo, sono analizzati tramite citometria a flusso.
Il citometro a flusso misura la diffusione luminosa e la fluorescenza delle cellule. Rende possibile la delimitazione della popolazione di interesse all'interno della finestra elettronica definita su un istogramma, che mette in correlazione la diffusione ortogonale della luce (dispersione laterale o SS) e la diffusione della luce ad angolo stretto (dispersione in avanti o FS). Altri istogrammi che uniscono due dei vari parametri diversi disponibili sul citometro possono essere usati come supporto nella fase di gating in funzione dell'applicazione scelta dall'utente.

ESEMPI DI APPLICAZIONI CLINICHE
L'antigene CD11b è utile per il rilevamento e la caratterizzazione dei disturbi ematologici (4-6). La molecola CD11b è espressa nella leucemia monoblastica acuta e nella leucemia monocitica acuta. Le anomalie di espressione CD11b hanno un significato prognostico nelle sindromi mielodisplastiche (MDS). I pazienti con una bassa percentuale di cellule del midollo osseo che esprimono CD11b hanno un elevato rischio di evoluzione in leucemia mieloide acuta rispetto ai pazienti con oltre il 53% delle cellule del midollo che esprimono CD11b (4). Inoltre, a volte l'antigene CD11b può essere osservato nella leucemia linfocitica granulare a grandi cellule T (7).

CONSERVAZIONE E STABILITÀ
Le forme liquide coniugate devono essere mantenute ad una temperatura tra 2 e 8 °C, al riparo dalla luce, prima e dopo l'apertura della fiala.
Stabilità di una fiala chiusa: vedere la data di scadenza sulla fiala.
Stabilità di una fiala aperta: il reagente è stabile per 180 giorni.

CONTENUTO DEI REAGENTI
Concentrazione: Vedere il Certificato di analisi specifico del lotto sul sito www.beckmancoulter.com.

SEGNI DI DETERIORAMENTO
Ogni variazione nell'aspetto fisico dei reagenti potrebbe indicare deterioramento. Tali reagenti non devono essere utilizzati.
In caso di deterioramento dell'imballaggio o se i dati ottenuti presentano alcune alterazioni nelle prestazioni, rivolgersi al distributore locale o inviare un'e-mail al seguente indirizzo: immuno-techsup@beckmancoulter.com

PRECAUZIONI
1. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza.
2. Non congelare.
3. Attendere che raggiunga la temperatura ambiente (18 – 25 °C) prima dell'uso.
4. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce.
5. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti per non ottenere falsi risultati.
6. Le soluzioni di anticorpi che contengono sodio azide (NaN_3) devono essere maneggiate con cura. Non ingerire ed evitare il contatto con la pelle, le mucose e gli occhi.
   Inoltre, in condizioni acide, la sodio azide produce acido idrazoico potenzialmente pericoloso. Si consiglia si smaltirlo diluendo il reagente in un grande volume di acqua prima di prima di versarlo nelle tubazioni, in modo da evitare l'accumulo di sodio azide nei condotti metallici ed evitare il rischio di esplosione.
7. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente infettivi e devono essere maneggiati con cura (in particolare, indossare guanti, camice e occhiali protettivi).
8. Non pipettare mai usando la bocca ed evitare il contatto dei campioni con la pelle, le mucose e gli occhi.
9. Le provette di sangue e il materiale monouso utilizzato per il trattamento devono essere smaltiti in appositi recipienti destinati all'incenerimento.
10. Reagenti e rifiuti devono essere eliminati in conformità alle normative in vigore.

CAMPIONI
Il sangue venoso deve essere prelevato in provette sterili contenenti anticoagulante EDTA.
I campioni devono essere conservati a temperatura ambiente (18 – 25 °C) e non agitati. I campioni devono essere omogenati agitandoli con cura prima di prelevare il campione da analizzare.
I campioni devono essere analizzati entro 24 ore dal prelievo.

METODO
MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO
- Provette del campione e materiale necessario per campionamento
- Pipette automatiche con puntali monouso per 10, 100 e 500 µL.
- Provette per emolisi in plastica
- Sfere di calibrazione:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Reagente di lisi eritrocitaria con fase di lavaggio dopo la lisi. Ad esempio: VersaLyse (Cod. A09777).
- Reagente di fissazione dei leucociti. Ad esempio: IOTest 3 Fixative Solution (Cod. A07800).
- Topo Controllo isotipico Pacific Blue : reagente IOTest (Rif. A74764).
- Tampone (PBS: 0,01 M di fosfato di sodio; 0,145 M di cloruro di sodio; pH 7.2).
- Centrifuga.
- Miscelatore automatico (tipo Vortex).
- Citometro a flusso.

PROCEDURA
Per ogni campione analizzato, oltre alla provetta, si consiglia di utilizzare una provetta di controllo in cui miscelare le cellule in presenza di controllo isotipico (Rif. A74764).

1. Aggiungere 10 µL di anticorpi coniugati IOTest in ciascuna provetta e 10 µL di controllo isotipico in ciascuna provetta di controllo.
2. Aggiungere 100 µL di campione da analizzare in entrambe le provette. Miscelare delicatamente le provette con Vortex.
3. Incubare per almeno 15-20 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C), al riparo dalla luce.
4. Quindi eseguire la lisi degli eritrociti attenendosi alle raccomandazioni per il reagente di lisi utilizzato.
   Ad esempio, per utilizzare VersaLyse (Cod. A09777), fare riferimento alla scheda tecnica e seguire preferibilmente la procedura denominata "con fissazione concomitante", che consiste nell'aggiungere 1 mL della miscela di "Fix-and-Lyse" preparata estemporaneamente. Miscelare immediatamente con Vortex per un secondo ed incubare per 10 minuti a temperatura ambiente, al riparo dalla luce.
5. Centrifugare per 5 minuti a 150 x g a temperatura ambiente.
6. Eliminare il surnatante mediante aspirazione.
7. Risospendere il pellet di cellule in 3 ml di PBS.
8. Ripetere il passo 5.
9. Eliminare il surnatante mediante aspirazione e risospendere il pellet di cellule in:

- 0,5 mL di PBS più 0,1% di formaldeide, se i preparati devono essere conservati meno di 24 ore. (È possibile ottenere PBS con formaldeide allo 0,1% diluendo 12,5 µl di IOTest 3 Fixative Solution (Rif. A07800) alla sua concentrazione di 10X in 1 ml di PBS).
- 0,5 mL di PBS senza formaldeide, se i preparati devono essere analizzati entro 2 ore.

NOTA: in tutti i casi, mantenere i preparati ad una temperatura tra 2 e 8 °C, al riparo dalla luce.

PRESTAZIONI

I dati prestazionali si ottengono adottando la procedura descritta in precedenza su campioni entro 24 ore dal prelievo previamente raccolto su provette sterili con anticoagulante EDTA e conservato a 18-25 °C. L'analisi viene eseguita entro 24 ore dall'immunocolorazione.

SPECIFICITÀ

L'antigene CD11b è noto anche con altre denominazioni, ovvero catena alfa M integrina, Mac-1, CR3, iC3bR o Mo1 (8, 9). È una glicoproteina transmembrana integrale di tipo I di 170 – 165 kDa, rispettivamente in condizioni di riduzione/non riduzione. L'antigene CD11b mostra 19 potenziali siti di glicosilazione N (8). L'espressione della catena CD11b sulla superficie cellulare richiede la presenza dell'antigene CD18 (chiamato anche catena beta2 integrina). Queste due subunità combinano l'integrina CD11b/CD18, una dei 4 eterodimeri dell'integrina che possono essere formati dall'associazione della catena CD18 beta con 4 diverse catene CD11 alfa. L'integrina CD11b/CD18 (αMβ2) è denominata anche Mac-1. L'integrina CD11b/CD18 presenta ampie capacità di legame con il ligando. Tra gli altri ligandi, si possono riconoscere CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, iC3b del componente complementare, fibrinogeno e LPS/LBP (complesso di lipopolisaccaride (LPS) e proteina legante LPS) (8). Inoltre, non vi sono prove di interazioni intramembrana di CD11b/CD18 con molecole superficiali legata al GPI, come CD16 o CD14 (10). Tali interazioni possono rappresentare funzioni di segnalazione transmembrana ed effettore dei recettori di membrana con legame GPI. CD11b/CD18 viene fortemente espresso sulle cellule NK, sui neutrofili, sui monociti e sui macrofagi.

L'anticorpo monoclonale BEAR1 (9) è stato assegnato all'antigene CD11b durante il 6th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (VI Workshop HLDA sugli antigeni di differenziazione dei leucociti umani), tenutosi a Kobe, in Giappone, nel 1996 (Codice WS: A015, Sezione Adhesion Molecules (Molecole di adesione)) (8).

PRECISIONE

La percentuale di colorazione di un target positivo è stato determinato utilizzando due campioni di sangue intero, eseguito in dieci replicati, lo stesso giorno e con lo stesso citometro. I risultati ottenuti sono riepilogati nella seguente tabella:

Target positivo	Numero	Media (%)		SD		CV (%)	
		Donatore 1	Donatore 2	Donatore 1	Donatore 2	Donatore 1	Donatore 2
Linfociti CD11b $^+$	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monociti CD11b $^+$	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulociti CD11b $^+$	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

LIMITE DI RILEVAMENTO

È stato effettuato uno studio in conformità al CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1). Il limite di rilevamento (LOD) è la più bassa concentrazione di analita che può essere costantemente rilevata. I risultati ottenuti sono riepilogati nella seguente tabella:

Target positivo	Limite di rilevamento
Linfociti CD11b $^+$	2,0 Cells/ µL
Monociti CD11b $^+$	2,0 Cells/ µL
Granulociti CD11b $^+$	1,0 Cells/ µL

LIMITAZIONI DELLA TECNICA

1. La citometria a flusso potrebbe produrre falsi risultati se il citometro non è stato allineato perfettamente, se le perdite di fluorescenza non sono state compensate correttamente e se le regioni non sono state posizionate con cura.
2. È preferibile utilizzare una tecnica di lisi degli eritrociti con una fase di lavaggio in quanto il reagente non è stato ottimizzato per tecniche di lisi "senza lavaggio".
3. Risultati accurati e riproducibili saranno ottenuti se le procedure utilizzate sono conformi alla scheda tecnica e compatibili alle buone pratiche di laboratorio.
4. L'anticorpo coniugato di questo reagente è calibrato in modo da offrire il miglior rapporto segnale specifico/segnale non specifico. Pertanto, è importante attenersi al rapporto volume reagente/volume campione in ogni test.
5. In caso di iperleucocitosi, diluire il sangue in PBS fino ad ottenere un valore di circa 5 x 10^9 leucociti/L (2).
6. In alcuni stati patologici, come ad esempio insufficienza renale grave o emoglobinopatie, la lisi degli eritrociti può essere lenta, incompleta o persino impossibile. In tal caso, è consigliabile isolare le cellule mononucleate mediante gradiente di densità (ad esempio, Ficoll) prima della colorazione (3).

VARIE

Per esempi e riferimenti, consultare Appendice.

MARCHI DI FABBRICA

Beckman Coulter, il logo stilizzatoFlow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios e VersaLyse sono marchi di fabbrica di Beckman Coulter, Inc. e sono registrati in USPTO.

Pacific Blue è un marchio di fabbrica di Molecular Probes, Inc.

PRODOTTO DA :

IMMUNOTECH SAS
A Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Assistenza clienti: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Tutti i diritti riservati.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 testes; 0,5 mL
10 µL / teste

IOTest
Anticorpo Conjugado

IVD

CE

PORTUGUÊS	Especificações
Especificidade	CD11b
Clone	Bear1
Hibridoma	SP2/0 x balb/c
Imunogénio	Purified human monocytes
Imunoglobulina	IgG1
Espécies	Ratinho
Fonte	Fluido de ascite ou sobrenadante de células de hibridoma por cultura in vitro
Purificação	Cromatografia de afinidade
Fluorocromo	Pacific Blue
Razão molar	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ excitação	405 nm
Pico da Emissão	455 nm
Tampão	PBS pH 7,2 mais 2 mg / mL BSA e 0,1% NaN_3

UTILIZAÇÃO
Este anticorpo conjugado de fluorocromo permite a identificação das populações de células que transmitem o CD11b antigénio presente no sangue periférico humano utilizando o citometria de fluxo.

PRINCÍPIO
Este teste é baseado na capacidade dos anticorpos monoclonais específicos em se ligarem aos determinantes antigénicos expressos por leucócitos.
A coloração específica dos leucócitos é efectuada pela incubação da amostra com o reagente IOTest. Os glóbulos vermelhos são então removidos por lise e os leucócitos, que não são afectados por este processo, são analisados pela citometria de fluxo.
O citómetro de fluxo mede a difusão da luz e a fluorescência das células. Ele possibilita a delimitação da população de interesse na janela electrónica definida num histograma, que correlaciona a difusão ortogonal da luz (Dispersão lateral ou SS) e a difusão da luz de ângulo apertado (Dispersão frontal ou FS). Outros histogramas combinando dois dos diferentes parâmetros disponíveis no citómetro podem ser utilizados como suportes na fase de delimitação, dependendo da aplicação escolhida pelo utilizador.

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES CLÍNICAS
O CD11b é útil para detecção e caracterização de doenças hematológicas (4-6). A molécula CD11b transmitida em leucemia monoblástica aguda e em leucemia monocítica aguda. As anormalidades da transmissão de CD11b tiveram um significado de prognóstico nos síndromas mielodisplásticos (MDS). Os pacientes com uma percentagem baixa de células da medula óssea transmitindo CD11b têm um risco mais elevado de evolução para leucemia mielóide aguda comparativamente aos pacientes com mais de 53% células da medula transmitindo CD11b (4). Além disso, o CD11b pode por vezes ser observado em leucemia linfócita granual grande de célula T (7).

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
As formas de líquidos conjugados devem ser mantidas entre 2 e 8°C e protegidas da luz, antes e depois do tubo ter sido aberto.
Estabilidade do tubo fechado: Consulte a data de validade no tubo.
Estabilidade do tubo aberto: O reagente é estável durante 180 dias.

CONSTITUIÇÃO DOS REAGENTES
Concentração: Consulte o Certificado de análise específico do lote em www.beckmancoulter.com.

EVIDÊNCIA DE DEGRADAÇÃO
Qualquer alteração no aspecto físico dos reagentes pode indicar deterioração e o reagente não deve ser utilizado.
No caso de deterioração da embalagem ou se os dados obtidos mostrarem alguma alteração no desempenho, contacte o distribuidor local ou utilize o seguinte endereço de e-mail:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

PRECAUÇÕES
1. Não utilize o reagente além da data de validade.
2. Não congele.
3. Deixe-o atingir a temperatura da sala (18 – 25°C) antes de utilizar.
4. Minimize a exposição à luz.
5. Evite contaminação microbiana dos reagentes, pois podem ocorrer resultados falsos.
6. As soluções de anticorpos contendo azida de sódio (NaN_3) devem ser manuseadas com cuidado. Não coloque na boca e evite o contacto com a pele, mucosa e olhos.
   Além disso, num meio ácido, a azida de sódio pode formar ácido hidrazóico potencialmente perigoso. Se for necessário descartar, é recomendado que o reagente seja diluído num grande volume de água antes de se deitado no sistema de drenagem, de modo a evitar a acumulação de azida de sódio nos tubos metálicos e para evitar o risco de explosão.
7. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infecciosas e devem ser manuseadas com cuidado (em particular: A utilização de luvas de protecção, batas e óculos).
8. Nunca pipete e evite o contacto das amostras com a pele, mucosa e olhos.
9. Os tubos de sangue e o material descartável utilizado para manuseamento deve descartado em recipientes ad hoc destinados a incineração.
10. Os reagentes e os desperdícios devem ser eliminados de acordo com os requisitos locais.

AMOSTRAS
O sangue venoso deve ser tirado utilizando tubos esterilizados contendo um sal EDTA como o anticoagulante.
As amostras devem ser mantidas à temperatura da sala (18 – 25°C) e não devem ser agitadas. As amostras devem ser homogeneizadas através de agitação cuidada antes da recolha da amostra de teste.
As amostras devem ser analisadas no prazo de 24 horas da venipunção.

METODOLOGIA
MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO
- Tubos de amostras e material necessário para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 10, 100 e 500 µL.
- Tubos plásticos de hemólise.
- Esferas de calibração:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Reagente de lise de glóbulos vermelhos com fase de lavagem após lise. Por exemplo: VersaLyse (Refª A09777).
- Reagente de fixação de leucócitos. Por exemplo: IOTest 3 Fixative Solution (Refª. A07800).
- Ratinho Controlo Isotípico Pacific Blue : reagente IOTest (Ref. A74764).
- Solução tampão (PBS: 0,01 M de fosfato de sódio; 0,145 M de cloreto de sódio; pH 7,2).
- Centrifugadora.
- Agitadora automática (tipo Vortex).
- Citómetro de fluxo.

PROCEDIMENTO
Para cada amostra analisada, além do tubo de teste, é recomendado um tubo de controlo onde as células são misturadas na presença do controlo isotópico (Refª A74764).

1. Adicione 10 µL de anticorpo conjugado de IOTest específico em cada tubo de teste e 10 µL do controlo isotípico em cada tubo de controlo.
2. Adicione 100 µL da amostra de teste em ambos os tubos. Efectue a agitação dos tubos cuidadosamente.
3. Incube durante 15 a 20 minutos à temperatura ambiente (18 a 25 °C), protegendo da luz.
4. Depois, efectue a lise dos glóbulos vermelhos, seguindo as recomendações do reagente de lise utilizado.
   Por exemplo, se pretender utilizar VersaLyse (Refª A09777), consulte o folheto e siga, preferencialmente, o procedimento denominado "com fixação concomitante", que consiste na adição de 1 mL da mistura "Fix-and-Lyse" preparada extemporaneamente. Agite imediatamente durante um segundo e incube durante 10 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz.
5. Centrifugue durante 5 minutos a 150 x g, à temperatura ambiente.
6. Aspire o material flutuante.
7. Ressuspenda o precipitado celular utilizando 3 mL de PBS.
8. Repita o passo 5.

9. Aspire o material flutuante e ressuspenda o precipitado utilizando:
- 0,5 mL de PBS mais 0,1% de formaldeído se as preparações forem para ser mantidas menos de 24 horas. (Um PBS de 0,1% de formaldeído pode ser obtido diluindo 12,5 µL da Solução fixativa IOTest 3 (Refª A07800) e a sua concentração de 10X em 1 mL de PBS).
- 0,5 mL de PBS sem formaldeído, se as preparações se destinarem a ser analisadas no prazo de 2 horas.

NOTA: Em todos os casos, mantenha as preparações entre 2 e 8°C e protegidas da luz.

DESEMPENHO

Os dados de desempenho são obtidos utilizando o procedimento descrito acima sobre amostras no prazo de 24 horas da venipunção previamente recolhida em tubos esterilizados com sal EDTA como anticoagulante, e armazenadas entre 18 e 25°C. A análise é efectuada no prazo de 24 horas a seguir à imunocoloração.

ESPECIFICIDADE

O antigénio CD11b também é referido com vários outros nomes, por exemplo, i.e. cadeia integrina alpha-M, Mac-1, CR3, iC3bR ou Mo1 (8, 9). Ela é uma glicoproteína de transmembrana integral do tipo I de 170 – 165 kDa em condições de redução/não redução, respectivamente. O CD11b mostra 19 locais potenciais de N-glicosilação (8).
A expressão da cadeia CD11b na superfície celular requer a presença do antigénio CD18 (também denominada de cadeia integrina beta2). Estas duas sub-unidades combinam-se para criarem a integrina CD11b/CD18, um dos quatro heterodímeros das integrinas que podem resultar da associação da cadeia CD18 beta com 4 cadeias CD11 alpha. A integrina CD11b/CD18 (αMβ2) também é denominada Mac-1. A integrina CD11b/CD18 tem uma vasta gama de capacidades de ligação. Ela pode reconhecer CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, componentes de complemento iC3b, fibrinogénio e LPS/LBP (complexo de lipopolissacaride (LPS) e proteína de ligação LPS), entre outras ligações (8). Adicionalmente, há evidência de interacções intra-membrana de CD11b/CD18 com moléculas de superfície ancoradas de GPI como, por exemplo, CD16 ou CD14 (10). Estas interacções podem contar para funções efectoras e de sinalização da transmembrana dos receptores da membrana ligada a GPI. O CD11b/CD18 expressa-se altamente em linfócitos NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos.
O anticorpo monoclonal BEAR1 (9) foi atribuído ao CD11b durante o 6° workshop HLDA sob o tema Human Leucocyte Differentiation Antigens em Kobe, Japão, em 1996 (WS Code: A015, Section Adhesion Molecules) (8).

PRECISÃO

A percentagem de coloração de um alvo positivo foi determinada utilizando duas amostras de sangue completas, processadas em dez replicações, no mesmo dia e utilizando o mesmo citómetro. Os resultados obtidos são resumidos na tabela seguinte:

Alvo positivo	Número	Meio (%)		SD		CV (%)	
		Dador 1	Dador 2	Dador 1	Dador 2	Dador 1	Dador 2
Linfócitos CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monócitos CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulócitos CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

LIMITE DE DETECÇÃO

Foi conduzido um estudo de acordo com CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). O LOD (Limit of Detection) é a concentração mais baixa de analito que pode ser detectada consistentemente. Os resultados obtidos são resumidos na tabela seguinte:

Alvo positivo	Limite de detecção
Linfócitos CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monócitos CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulócitos CD11b +	1,0 Cells/ µL

LIMITAÇÕES DA TÉCNICA

1. A citometria de fluxo pode produzir resultados falsos se o citómetro não estiver perfeitamente alinhado, se as fugas de fluorescência não tiverem sido correctamente compensadas e se as regiões não tiverem sido cuidadosamente posicionadas.
2. É preferível utilizar uma técnica de lise RBC com um passo de lavagem pois este reagente não foi optimizado para técnicas de lise "sem lavagem".
3. Os resultados precisos e reproduzíveis serão obtidos desde que os procedimentos utilizados estejam em conformidade com o folheto de inserção técnico e sejam compatíveis com as boas práticas laboratoriais.
4. O anticorpo conjugado deste reagente está calibrado de modo a oferecer a melhor relação de sinal específico/não específico. Por isso, é importante aderir à relação de volume de reagente/volume de amostra em todos os testes.
5. No caso de um hiperleucocitosis, dilua o sangue em PBS de modo a obter um valor de aproximadamente 5 x 10^9 leucócitos/L (2).
6. Em certos estados da doença, como falha renal grave ou hemoglobinopatias, a lise dos glóbulos vermelhos pode ser lenta, incompleta ou mesmo impossível. Neste caso, é recomendado o isolamento das células mononucleadas utilizando um gradiente de densidade (Ficoll, por exemplo) antes da coloração (3).

VÁRIOS

Consulte o Anexo para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logótipo estilizado, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios e VersaLyse são marcas comerciais da Beckman Coulter, Inc., e registadas na USPTO.

Pacific Blue é uma marca comercial da Molecular Probes, Inc.

FABRICADO POR:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Apoio ao cliente : (33) 4 91 17 27 27

Beckman Coulter do Brasil Com e Imp de Prod de Lab Ltda
Estr dos Romeiros, 220 - Galpao G3 - Km 38.5
zip code 06501-001 - Sao Paulo - SP - Brasil
CNPJ: 42.160.812/0001-44

www.beckmancoulter.com

Impresso em France.
Produzido em France

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Todos os direitos reservados.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 tester; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Konjugert antistoff

IVD

CE

NORSK	Spesifikasjoner
Spesifisitet	CD11b
Klone	Bear1
Hybridom	SP2/0 x balb/c
Immunogen	Purified human monocytes
Immunoglobulin	IgG1
Art	Mus
Kilde	Ascitesvæske eller supernatant av hybridomceller dyrket in vitro
Rensing	Affinitetskromatografi
Fluorokrom	Pacific Blue
Molarforhold	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ eksitering	405 nm
Emisjonstopp	455 nm
Buffer	PBS pH 7,2 pluss 2 mg / mL BSA og 0,1% NaN_3

ANVENDELSE
Dette fluorkrom-konjugerte antistoffet gjør det mulig å identifisere cellepopulasjoner som uttrykker CD11b mengden antigen som finnes i menneskets perifere blod ved hjelp av strømningscytometri.

PRINSIPP
Denne testen er basert på spesifikke monoklonale antistoffers evne til å binde seg til antigenetiske determinanter, uttrykt gjennom leukocytter.
Spesifikk farging av leukocytter gjennomføres ved å inkubere en prøve med IOTest-reagens. De røde cellene blir deretter fjernet ved hjelp av lyse og leukocyttene, som forblir upåvirket av denne prosessen, analyseres med bruk av strømningscytometri.
Strømningscytometret måler lysspredning og cellers fluorescens. Det gjør det mulig å avgrense den populasjonen som er av interesse innenfor et elektronisk vindu, definert på et histogram som bringer den ortogonale spredningen av lys (Side Scatter eller SS) i overensstemmelse med spredningen av trangvinklet lys (Forward Scatter eller FS). Andre histogrammer som kombinerer to av de ulike parametrene som er tilgjengelige på cytometret kan brukes som støtte i inngangsfasen, avhengig av hvilket program som brukeren har valgt.

EKSEMPLER PÅ KLINISK BRUK
CD11b er anvendelig for påvisning og karakterisering av hematologiske forstyrrelser (4-6). CD11b-molekylet kommer til uttrykk i akutt monoblastic leukemi og akutt monocyttisk leukemi. Abnormiteter i CD11b-uttrykk har prognostisk betydning for myelodysplastisk syndrom (MDS). Pasienter med en lav prosentandel benmargceller der CD11b kommer til uttrykk har høyere risiko for utvikling av akutt myelogen leukemi, sammenlignet med pasienter der mer enn 53 % av marg-cellene er uttrykk for CD11b (4) I tillegg kan CD11b noen ganger observeres på T-celler ved stor granulær lymfocytt-leukemi (7).

OPPBEVARING/LAGRING OG STABILITET
De konjugerte flytende formene må oppbevares under en temperatur på mellom 2 °C og 8 °C og være beskyttet mot lys, både før og etter at hetteglasset er åpnet.
Stabilitet for lukket hetteglass: Se utløpsdato på hetteglasset.
Stabilitet for åpnet hetteglass: Reagensen er stabil i 180 dager.

REAGENSINNHOLD
Konsentrasjon: Se partispesifikt analysesertifikat på www.beckmancoulter.com.

TEGN PÅ FORRINGELSE
Enhver forandring av reagensenes fysiske utseende kan væretegn på forringelse og reagensen bør ikke brukes.
I tilfelle emballasjen skulle være ødelagt eller hvis dataene som er innhentet skulle vise endring mht. ytelse, kan du kontakte din lokale forhandler eller bruke følgende e-postadresse: immuno-techsup@beckmancoulter.com

FORSIKTIGHETSHENSYN
1. Ikke bruk reagensen etter utløpsdatoen.
2. Må ikke fryses ned.
3. La den oppnå romtemperatur (18-25 °C) før bruk.
4. Begrens eksponering for lys til et minimum.
5. Unngå mikrobiell forurensning av reagensene. Hvis så skjer, kan gale resultater forekomme.
6. Antistoff-løsninger som inneholder natriumazid (NaN_3) bør håndteres med forsiktighet. Slike løsninger er ikke til innvortes bruk. Unngå all kontakt med hud, slimhinner og øyne.
   Videre må nevnes at natriumazid i et surt medium kan danne potensielt farlig hydrogenazidsyre. Dersom det er behov for å kaste reagensen, anbefales det å fortynne reagensen med en stor mengde vann, før den helles i avløpssystemet, slik at man unngår opphopning av natriumazid i metallrør, og for å forebygge risiko for eksplosjon.
7. Alle blodprøver må betraktes som potensielt smittefarlige og må håndteres med forsiktighet (spesielt må du overholde bruk av beskyttende hansker, vernetøy og briller).
8. Pipettér aldri via munnen og unngå all kontakt med hud, slimhinner og øyne.
9. Reagensrør og engangsutstyr som brukes til håndtering skal kastes i beholdere som er beregnet på dette formålet og brennes.
10. Reagenser og avfall bør tilintetgjøres i henhold til lokale bestemmelser

PRØVER
Blod fra vener må tas ved hjelp av sterile rør som inneholder et EDTA-salt som antikoagulerende stoff.
Prøvene bør oppbevares ved romtemperatur (18 - 25 °C) og får ikke ristes. Prøvene bør homogeniseres ved hjelp av forsiktig bevegelse før testprøven tas.
Prøvene må analyseres innen 24 timer etter at blodet er tatt fra venene.

METODOLOGI
NØDVENDIG MATERIALE SOM IKKE FØLGER MED
- Prøverør og materiale som er nødvendig for prøvetaking.
- Automatiske pipetter med engangsspisser til 10, 100 og 500 µL.
- Hemolyserør i plast.
- Kalibreringsperler:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Rød cellelyse-reagens med vasketrinn etter lyse. For eksempel: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leukocyttfikseringsreagens. For eksempel: IOTest 3 fiksativ løsning (Ref. A07800).
- Mus Isotyp kontroll Pacific Blue: IOTest-reagens (Ref. A74764).
- Buffer (PBS: 0.01 M natriumfosfat; 0.145 M natriumklorid; pH 7.2).
- Sentrifuge.
- Automatisk agitator (virvel-type).
- Strømningscytometer.

PROSEDYRE
For hver prøve som analyseres i tillegg til prøverøret, anbefales det å bruke et kontrollrør der cellene blir blandet i isotypekontrollens nærvær (Ref. A74764).

1. Ha 10 µL av det spesifikke IOTest-konjugerte antistoffet opp i hvert prøverør, og 10 µL av isotype-kontrollen opp i hvert kontrollrør.
2. Ha 100 µL av prøven opp i begge rør. Rist rørene forsiktig.
3. Inkuber i 15 til 20 minutter ved romtemperatur (18 - 25 °C), beskyttet mot lys.
4. Deretter utfører du lyse av røde celler, og det ved å følge anbefalingene fra den lysereagensen som brukes.
   Hvis du for eksempel ønsker å benytte VersaLyse (Ref. A09777), se brosjyren og følg helst prosedyren som kalles "med ledsagende fiksering", noe som består i å ha oppi 1 mL av "Fikser-og-foreta-lyse"-blandingen som tilberedes på improvisert vis. Rist umiddelbart i ett sekund, og inkuber i 10 minutter ved romtemperatur, beskyttet mot lys.
5. Sentrifuger i fem minutter ved 150 x g ved romtemperatur.
6. Supernatanten fjernes ved aspirasjon.
7. Avbryt benyttelse av cellepellet, idet du bruker 3 mL PBS.
8. Gjenta trinn 5.
9. Fjern supernatanten ved aspirasjon og avbryt bruk av cellepellet, idet du benytter:

- 0.5 mL PBS pluss 0.1% formaldehyd dersom blandingene som er gjort klare skal oppbevares i mindre enn 24 timer. (A 0.1% formaldehyd PBS kan fås ved å fortynne 12,5 mL av den fiksative løsningen IOTest 3 (Ref. A07800) ved 10X konsentrasjon i 1 mL PBS).
- 0.5 mL PBS uten formaldehyd, dersom blandingene som er gjort klare skal analyseres innen 2 timer.

NB: Oppbevar i alle tilfeller blandingene på mellom 2 og 8 °C og beskyttet mot lys.

YTELSE

Ytelsesdata ble framskaffet under anvendelse av den framgangsmåten som er beskrevet ovenfor på prøver innen det hadde gått 24 timer fra blodprøvetaking, der blod ble fylt på sterile rør med EDTA-salt som antikoagulerende stoff og ved oppbevaring i en temperatur på 18-25 °C. Analyse ble utført i løpet av 24 timer etter immuno-farging.

SPESIFISITET

Antigenet CD11b henvises også til under flere andre navn, dvs. alpha-M-integrinkjede, Mac-1, CR3, iC3bR, eller Mo1 (8, 9). Det er et type I-integrert transmembran-glykoprotein på 170-165 kDa under reduserende, hhv. ikke-reduserende vilkår. CD11b viser 19 potensielle N-glykosyleringssteder (8).

Uttrykk for CD11b-kjeden på celleoverflaten krever at antigenet CD18 (også kjent som beta 2 integrinkjede) er tilstede. Disse to underenhetene kombineres for å skape CD11b/CD18-integrinen, en av de fire integrin-heterodimerne som kan bygges opp gjennom forening av CD18- beta-kjeden med fire karakteristiske CD11-alfakjeder. CD11b/CD18 (αMβ2)-integrinen kalles også Mac-1. CD11b/CD18 integrinen har utmerkede ligand-bindende evner. Det gjenkjenner CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, komplementkomponentet iC3b, fibrinogen og LPS/LBP ((et kompleks av lipopolysakkarid (LPS) og LPS-bindende protein)), pluss ytterligere ligander (8). I tillegg er det tegn på intra-membrane interaksjoner mellom CD11b/CD18 og GPI-forankrede overflatemolekyler som CD16 eller CD14 (10). Disse interaksjonene kan forklare transmembran signalisering og GPI-koblede membranreseptorers effektorfunksjoner. CD11b/CD18 kommer sterkt til uttrykk på NK-lymfocytter, nøytrofiler, monocytter og makrofager.

Det monoklonale antistoffet BEAR1 (9) ble koblet til CD11b under Det 6. HLDA-arbeidsseminaret om leukocyttdifferensierings-antigener hos mennesker, som ble holdt i 1996 i Kobe, Japan (WS-kode: A015, seksjonen Adhesjonsmolekyler) (8).

PRESISJON

Den prosentvise andelen av farging av et positivt mål ble fastsatt ved hjelp av to komplette blodprøver, gjennomført i ti omganger, på samme dag og ved hjelp av samme cytometer. Resultatene som ble oppnådd er oppsummert i tabellen nedenfor:

Positivt mål	Antall	Middel (%)		SD		CV (%)	
		Giver 1	Giver 2	Giver 1	Giver 2	Giver 1	Giver 2
Lymfocytter CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocytter CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocytter CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

DETEKSJONSBEGRENSNINGER

En studie ble gjennomført i henhold til CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Deteksjonsgrensen (LOD) er den laveste konsentrasjonen av analytt som konsekvent kan oppdages. Resultatene som ble oppnådd er oppsummert i tabellen nedenfor:

Positivt mål	Deteksjonsbegrensninger
Lymfocytter CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocytter CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocytter CD11b +	1,0 Cells/ µL

BEGRENSNINGER KNYTTET TIL TEKNIKKEN

1. Strømningscytometri kan gi falske resultater hvis cytometret ikke har blitt justert på en perfekt måte, dersom fluorescens-lekkasjer ikke er blitt korrekt kompensert for, og i tilfelle regioner ikke er omhyggelig posisjonert.
2. Det er å foretrekke dersom du bruker RBC-lyseteknikk med et vasketrinn, da denne reagensen ikke er optimalisert for "ingen vask"-lyseteknikker.
3. Nøyaktige og reproduserbare resultater oppnås så lenge prosedyrene som benyttes er i samsvar med den vedlagte brosjyren om teknikk og så framt prosedyrene er kompatible med god laboratoriepraksis.
4. Denne reagensens konjugerte antistoff er kalibrert for å gi et optimalt signal/ikke-spesifikt signal-forhold. Derfor er det viktig å overholde reagensens volum/prøvevolum-forhold for hver test.
5. I tilfelle hyperleukocytose fortynnes blodet i PBS, for å oppnå en verdi på ca 5 x 10^9 leukocytter/L (2).
6. Under visse sykdomstilstander, slik som ved alvorlig nyresvikt eller hemoglobinopatier, kan lyse av røde celler være treg, ufullstendig eller umulig. I slike tilfeller anbefales det å isolere mononukleærerte celler ved hjelp av en densitetsgradient (for eksempel Ficoll) før farging (3).

DIVERSE

Se vedlegg for eksempler og referanser.

VAREMERKER

Beckman Coulter, den stiliserte logoen, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios og VersaLyse er varemerker som tilhører Beckman Coulter, Inc., og er registrert hos USPTO.

Pacific Blue er et merkevarenavn tilhørende Molecular Probes, Inc.

PRODUSERT AV :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Kundetjeneste: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Alle rettigheter forbeholdt.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 test; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Konjugerad Antikropp

IVD CE

SVENSKA	Specifikationer
Specificitet	CD11b
Klon	Bear1
Hybridom	SP2/0 x balb/c
Immunogen	Purified human monocytes
Immunglobulin	IgG1
Art	Mus
Källa	Ascitesvätska eller supernatant från in vitro-odlade hybridomceller
Reningsmetod	Affinitetskromatografi
Fluorokrom	Pacific Blue
Molarförhållande	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
Excitationsvåglängd	405 nm
Emissionstopp	455 nm
Buffert	PBS pH 7,2 plus 2 mg / mL BSA och 0,1 % NaN_3

ANVÄNDNING
Denna fluorokromkonjugerade antikropp möjliggör identifiering av cellpopulationer som uttrycker CD11b antigenet närvarande i humant perifert blod med användning av flödescytometri.

PRINCIP
Detta test är baserat på förmågan hos specifika monoklonala antikroppar att bindas till antigena determinanter som uttrycks av leukocyter.
Specifik färgning av leukocyterna utförs genom inkubering av provet med IOTest-reagensen. Sedan avlägsnas de röda blodkropparna med lysering och leukocyterna, som är opåverkade av denna process, analyseras med flödescytometri.
Flödescytometern mäter ljusdiffusion och fluorescens av celler. Det möjliggör avgränsningen av populationen av intresse i den elektroniska fönstret definierat i ett histogram, som korrelerar den rätvinkliga ljusspridningen (sidospridning eller SS) och spridningem av snävt ljus (framåtspridning eller FS). Andra histogram som kombinerar två av de tillgängliga parametrarna på cytometern, kan användas som stöd i gating-skedet beroende på tillämpningen som användaren har valt.

EXEMPEL PÅ KLINISKA TILLÄMPNINGAR
CD11b är användbart för identifiering och karakterisering av hematologiska sjukdomar (4-6). CD11b-molekylen är uttryckt i akut monoblastisk leukemi och akut monocytic leukemi. Avvikelser i CD11b-uttryck har prognostisk betydelse i myelodysplastiskt syndrom (MDS). Patienter med en låg andel av benmärgsceller som uttrycker CD11b har en högre risk för utveckling av akut myeloisk leukemi jämfört med patienter med mer än 53 % av benmärgsceller som uttrycker CD11b (4). CD11b kan dessutom ibland observeras på T-cell stor granuler lymfocyter leukemi (7).

FÖRVARING OCH STABILITET
Konjugerade lösningar måste förvaras vid mellan 2 och 8 ° C och skyddas från ljus, före och efter det att ampullen har öppnats.
Stabiliteten i stängd flaska: se utgångsdatum på flaskan.
Stabiliteten i öppen flaskan: reagenset är stabil i 180 dagar.

REAGENSINNEHÅLL
Koncentration: Se det partispecifika analyscertifikatet på www.beckmancoulter.com.

TECKEN PÅ NEDBRYTNING
Någon förändring i fysiskt utseende av reagenserna kan indikera försämring och reagensen bör inte användas.
När det gäller förpackningsförsämring eller om erhållna data visar vissa prestandaförändringar, kontakta din lokala distributör eller använd följande e-postadress:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER
1. Använd inte reagens bortom utgångsdatum.
2. Får ej frysas.
3. Låt det komma till rumstemperatur (18-25 ° C) före användning.
4. Minimera exponeringen för ljus.
5. Mikrobiell kontaminering av reagenserna kan leda till falska resultat.
6. Antikroppslösningar som innehåller natriumazid (NaN_3) bör hanteras med försiktighet. Inta inte internt och undvik all kontakt med hud, slemhinnor och ögon.
   Dessutom, i ett surt medium kan natriumazid bilda den potentiellt farliga hydrazoicsyran. Om den måste bortskaffas, rekommenderas det att reagensen spädas i en stor mängd vatten innan du häller det i avloppssystemet för att undvika ansamling av natriumazid i metallrör och för att förhindra risken för explosion.
7. Alla blodprov måste betraktas som potentiellt smittförande och måste hanteras med omsorg (i synnerhet: att bära skyddshandskar, skyddsdräkter och glasögon).
8. Pipettera aldrig med munnen och undvik kontakt med prover med hud, slemhinnor och ögon.
9. Blodrör och engångsmaterial som används för hantering bör kasseras i ad hoc-behållare som är avsedda för förbränning.
10. Reagenser och avfall bör kasseras enligt lokala krav

PROVER
Venöst blod måste tas med sterila rör som innehåller ett EDTA-salt som det rekommenderade antikoaguleringsmedlet.
Proverna bör förvaras i rumstemperatur (18-25 ° C) och inte skakas. Proverna bör vara homogeniserade genom försiktig omrörning innan man tar provet.
Proverna måste analyseras inom 24 timmar efter venpunktion.

METOD
NÖDVÄNDIGT MATERIAL MEDFÖLJER INTE
- Provtagningsrör och material som behövs för provtagning.
- Automatiska pipetter med engångsspetsar för 10, 100 och 500 µL.
- Hemolysrör av plast
- Kalibreringsbäddar:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Red cellysisreagens med tvättskede efter lys. Till exempel: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leukocytfixeringsreagens. Till exempel: IOTest 3 fixerande lösning, (Ref. A07800).
- Mus Isotypisk kontroll Pacific Blue IOTest reagens: (Ref. A74764).
- Buffert (PBS: 0,01 M natriumfosfat, 0,145 M natriumklorid, pH 7,2).
- Centrifug.
- Automatisk omrörare (Vortex-typ).
- Flödescytometer

PROCEDUR
För varje analyserat prov, rekommenderas förutom provröret ett kontrollrör där cellerna blandas i närvaro av den isotypisk kontrollen (Ref. A74764).

1. Lägg till 10 mikroliter av specifik IOTest-konjugerad antikropp till varje provrör, och 10 mikroliter av isotypisk kontroll till varje kontrollrör.
2. Lägg till 100 mikroliter av testprovet till båda rören. Rör om rören försiktigt.
3. Inkubera i 15 till 20 minuter i rumstemperatur (18 – 25°C), skydda mot ljus.
4. Utför sedan lysering av de röda blodkropparna, genom att följa rekommendationer för den använda lysisreagensen.
   Till exempel, om du vill använda VersaLyse (Ref. A09777), läser du produktbladet och följer lämpligen beskrivningen under rubriken "med samtidig fixering", vilken består i att 1 ml "Fix-and-Lyse"-blandning bereds strax extemporerat. Rör om omedelbart i en sekund och inkubera i 10 minuter vid rumstemperatur, skyddat från ljus.
5. Centrifugera i 5 minuter på 150 x g i rumstemperatur.
6. Ta bort supernatanten genom aspiration.
7. Resuspendera cellpelleten med hjlp av 3 ml PBS.
8. Upprepa steg 5.
9. Avlägsna supernatanten genom aspiration och resuspendera cellpelleten med:

– 0,5 mL PBS plus 0,1% formaldehyd om preparaten är avsedda att förvaras mindre än 24 timmar. (A 0,1% formaldehyd PBS kan erhållas genom spädning av 12,5 mikroliter av IOTest3-fixeringslösningen (Ref. A07800) i dess 10X koncentration i 1 ml PBS).

- 0,5 mL PBS utan formaldehyd om preparaten är avsedda att förvaras mindre än 2 timmar.

OBS: I samtliga fall ska preparaten förvaras mellan 2 och 8 ° C och skyddas från ljus.

PRESTANDA

Prestandadata erhålls enligt beskrivningen ovan på prov inom 24 timmar efter venpunktionen av tidigare insamlat på sterila rör med EDTA-salt som antikoagulant och förvaras vid 18-25 ° C. Analys utförs inom 24 timmar efter immunfärgning.

SPECIFICITET

CD11b-antigenen går också under flera andra namn dvs alpha-M-integrin-kedja, Mac-1, CR3, iC3bR eller Mo1 (8, 9). Det är ett typ I integralr transmembranglykoprotein av 170-165 kDa under reducerande/icke-reducerande förhållanden, respektive. CD11b visar 19 potentiella N-glycosylation-platser (8).
Uttryck av CD11b-kedjan på cellens yta kräver närvaro av CD18-antigen (kallas även beta2 integrinkedja). Dessa två subenheter kombineras för att skapa integrinet CD11b/CD18, en av fyra integrinheterodimerer som kan byggas genom association av CD18-beta-kedjan med fyra olika CD11-alfa-kedjor. Integrinet CD11b/CD18 (αMβ2) kallas också Mac-1. CD11b/CD18-integrinet har bred ligand bindandningsförmåga. Det kan känna igen CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, komplementkomponent iC3b, fibrinogen och LPS/LBP (komplex av lipopolysackarid (LPS) och LPS-bindande protein), bland andra ligander (8). Dessutom finns det bevis för intra-membran växelverkan mellan CD11b/CD18 och GPI-förankrade ytmolekyler som CD16 eller CD14 (10). Dessa interaktioner kan stå för transmembransignalerings och effektorfunktionerna av GPI-länkade membranreceptorer. CD11b/CD18 uttrycks mycket på NK-lymfyter, neutrofiler, monocyter och makrofager.
BEAR1 monoklonal antikropp (9) tilldelades till CD11b under den 6:e HLDA-workshop om mänskliga leukocytdifferentieringsantigener, som hölls i Kobe, Japan, 1996 (WS-kod: A015, avsnitt adhesionsmolekyler) (8).

PRECISION

Den procentuella färgningen av ett positivt mål bestämdes med hjälp av två helblodsprover, körda i tio replikat, på samma dag och med samma cytometer. Resultaten sammanfattas i följande tabell:

Positivt mål	Antal	Genomsnitt (%)		SD		CV (%)	
		Donator 1	Donator 2	Donator 1	Donator 2	Donator 1	Donator 2
Lymfocyt CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocyt CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocyt CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

DETEKTIONSGRÄNS

En studie genomfördes enligt CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Detektionsgränsen (LOD) är den lägsta koncentrationen av analyt som konsekvent kan upptäckas. Resultaten som erhölls sammanfattas i följande tabell:

Positivt mål	Detektionsgräns
Lymfocyt CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocyt CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocyt CD11b +	1,0 Cells/ µL

TEKNIKENS BEGRÄNSNINGAR

1. Flödescytometrin kan ge falska resultat om cytometern inte har blivit perfekt inställd, om fluorescenserna inte har blivit korrekt kompenserade och om regionerna inte har blivit omsorgsfullt satta.
2. Det är att föredra att använda en lyseringsmetod med tvätt eftersom detta reagens inte har optimerats för "no wash"-lyseringsmetoder.
3. Noggranna och reproducerbara resultat erhålls så länge förfaranden som används är i enlighet med den medlagda tekniska broschyren och god laboratoriesed.
4. Den konjugerade antikroppen av reagensen är kalibrerad för att ge bästa specifika signal/icke-specifik signal. Därför är det viktigt att hålla sig till reagens/provvolym vid varje analys.
5. I fallet med en leukocytos, späd blodet i PBS för att erhålla ett värde på ungefär 5 x 10^9 leukocyter/L (2).
6. Vid vissa sjukdomstillstånd, t.ex. svårartad njursvikt eller hemoglobinopati, kan lysering av röda blodkroppar vara långsam, ofullständig eller till och med omöjlig. I detta fall är det rekommenderat att isolera mononukleära celler med användning av en densitetsgradient (till exempel Ficoll) innan färgningen (3).

DIVERSE

Se Appendixet för exempel och referenser.

VARUMÄRKEN

Beckman Coulter, den stiliserade logotypen, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios och VersaLyse är varumärken som tillhör Beckman Coulter, Inc., och är registrerade hos USPTO .

Pacific Blue är ett varumärke som tillhör Molecular Probes, Inc.

TILLVERKAT AV :

IMMUNOTECH SAS
ett Beckman Coulter-företag
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Kundtjänst: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Med ensamrätt.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 testů; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Konjugovaná protilátka

IVD CE

ČESKY	Specifikace
Specificita	CD11b
Klon	Bear1
Hybridom	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Purified human monocytes
Imunoglobulin	IgG1
Živočišný druh	Myš
Zdroj	Ascitická tekutina nebo supernatant hybridomových buněk kultivovaných in vitro
Purifikace	Afinitní chromatografie
Fluorochrom	Pacific Blue
Molární poměr	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ excitace	405 nm
Maximum emise	455 nm
Tlumivý roztok	PBS pH 7,2 plus 2 mg / mL BSA a 0,1% NaN_3

POUŽITÍ
Tato protilátka konjugovaná s fluorochromem umožňuje identifikaci buněčných populací exprimujících antigen CD11b přítomných v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie.

PRINCIP
Tento test je založen na schopnosti určitých monoklonálních protilátek vázat se na antigenní determinanty exprimované leukocyty.
Specifické barvení leukocytů se provádí inkubací vzorku s reagencií IOTest. Erytrocyty se poté lyzují a leukocyty, které nejsou tímto procesem nijak poškozené, jsou analyzovány průtokovou cytometrií.
Průtoková cytometrie měří světelný rozptyl a fluorescenci buněk. Umožňuje vymezení populace zájmu v elektronickém okně definovaném na histogramu, které koreluje s kolmým rozptylem světla (boční rozptyl nebo SS (= Side Scatter)) a rozptylem konvergentního světla (přímý rozptyl nebo FS (= Forward Scatter)). Další histogramy kombinující dva různé parametry dostupné na cytometru lze použít ve stadiu ohraničování jako podpůrné, a to v závislosti na použití zvoleném uživatelem.

PŘÍKLADY KLINICKÝCH POUŽITÍ
Protein CD11b je užitečný k detekci a charakterizaci hematologických poruch (4–6). CD11b je exprimován u akutní monoblastické leukémie a akutní monocytické leukémie. Abnormality exprese CD11b mají prognostický význam u myelodysplastických syndromů (MDS). Pacienti s nízkým procentem buněk kostní dřeně exprimujících CD11b mají vyšší riziko rozvoje akutní myeloidní leukémie v porovnání s pacienty s více než 53 % buněk dřeně exprimujícími CD11b (4). Navíc lze CD11b někdy detekovat i u leukémie velkých granulárních T-lymfocytů (7).

SKLADOVÁNÍ A STABILITA
Konjugované kapalné formy je třeba uchovávat při teplotě 2 až 8 °C a chránit je před světlem před i po otevření lahvičky.
Stabilita uzavřené lahvičky: viz datum spotřeby na lahvičce.
Stabilita otevřené lahvičky: reagencie je stabilní po dobu 180 dnů.

OBSAH REAGENCIE
Koncentrace: Viz certifikát analýzy pro danou šarži na www.beckmancoulter.com.

ZNÁMKY ZNEHODNOCENÍ
Jakákoliv změna fyzického vzhledu reagencií může značit znehodnocení a reagencie nesmí být použita.
V případě poškození obalu nebo vykazují-li získaná data změnu účinnosti metody, kontaktujte svého místního distributora nebo použijte následující e-mailovou adresu:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ
1. Reagencie nepoužívejte po uplynutí data spotřeby.
2. Reagencie nezmrazujte.
3. Nechejte reagencii před použitím ohřát na pokojovou teplotu (18–25 °C).
4. Minimalizujte expozici světlu.
5. Zabraňte mikrobiologické kontaminaci reagencií, protože může vést k chybným výsledkům.
6. S roztoky protilátek obsahujících azid sodný (NaN_3) je třeba zacházet opatrně. Nepoužívejte vnitřně a vyhýbejte se jakémukoliv kontaktu s kůží, sliznicemi a očima.
   Mimo to může azid sodný v kyselém médiu vytvářet potenciálně nebezpečnou kyselinu azidovodíkovou. Je-li potřeba reagencii zlikvidovat, doporučuje se ji naředit před vylitím do odpadního systému velkým množstvím vody, aby nedošlo k nahromadění azidu sodného v kovových potrubích a zabránilo se riziku exploze.
7. Se všemi vzorky krve je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a je třeba s nimi manipulovat opatrně (zejména: nosit ochranné rukavice, pláště a ochranné brýle).
8. Nikdy nepipetujte ústy a vyhýbejte se kontaktu vzorků s kůží, sliznicemi a očima.
9. Zkumavky s krví a jednorázový materiál použitý při manipulaci je nutné zlikvidovat v nádobách ad hoc určených ke spálení.
10. Reagencie a odpad je třeba zlikvidovat v souladu s místními požadavky.

VZORKY
Žilní krev se musí odebírat do sterilních zkumavek obsahujících jako antikoagulans sůl EDTA.
Vzorky je nutné uchovávat při pokojové teplotě (18–25 °C) a neprotřepávat. Před odebráním testovaného vzorku je třeba vzorky homogenizovat lehkým promícháním.
Vzorky je nutné analyzovat do 24 hodin od venepunkce.

METODOLOGIE
POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ
- Zkumavky na vzorky a materiál nezbytný k odběru vzorků.
- Automatické pipety s jednorázovými špičkami na 10, 100 a 500 µl.
- Plastové hemylozační zkumavky.
- Kalibrační kapky:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Reagencie k lýze erytrocytů s promývacím krokem po lýze. Například: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagencie k fixaci leukocytů. Například: Fixační roztok IOTest 3 (Ref. A07800).
- Myš Izotypová kontrola Pacific Blue: reagencie řady IOTest (Ref. A74764).
- Pufr (PBS: 0,01 M fosforečnan sodný; 0,145 M chlorid sodný; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatické míchadlo (vířivého typu).
- Průtokový cytometr.

POSTUP
U každého analyzovaného vzorku se doporučuje kromě testovací zkumavky připravit jednu kontrolní zkumavku, v níž jsou buňky smíchány za přítomnosti isotypické kontroly (Ref. A74764).

1. Přidejte 10 µl specifické konjugované protilátky IOTest ke každé testované zkumavce a 10 µl isotypické kontroly ke každé kontrolní zkumavce.
2. Přidejte 100 µl testovaného vzorku do obou zkumavek. Opatrně zkumavky promíchejte.
3. Inkubujte při pokojové teplotě (18–25 °C) po dobu 15 až 20 minut, chraňte před světlem.
4. Poté proveďte lýzu erytrocytů podle doporučení pro použitou lyzační reagencii. Např. pokud chcete použít reagencii VersaLyse (Ref. A09777), přečtěte si příbalový leták a řiďte se pokud možno postupem nazvaným „s konkomitantní fixací“, jehož podstatou je přidání 1 ml směsi „Fix-and-Lyse“ připravené bez zvláštní přípravy. Následně vzorky okamžitě promíchejte po dobu jedné sekundy a inkubujte je 10 minut při pokojové teplotě, chraňte před světlem.
5. Centrifugujte po dobu 5 minut při 150 x g při pokojové teplotě.
6. Odsajte supernatant.
7. Resuspendujte buněčný pelet v 3 ml PBS.
8. Opakujte krok 5.
9. Odsajte supernatant a resuspendujte buněčný pelet v:

- 0,5 ml PBS plus 0,1% formaldehyd, pokud je preparáty třeba uchovávat kratší dobu než 24 hodin. (0,1% formaldehyd-PBS lze získat rozpuštěním 12,5 µl fixačního roztoku IOTest 3 (Ref. A07800) v jeho 10X koncentraci v 1 ml PBS).
- 0,5 ml PBS bez formaldehydu, pokud mají být preparáty analyzovány do 2 hodin.

POZNÁMKA: V každém případě uchovávejte preparáty při teplotě 2 až 8 °C a chraňte je před světlem.

FUNKČNOST

Data o funkčnosti lze získat pomocí výše uvedeného postupu ze vzorků odebraných dříve do sterilních zkumavek se solí EDTA jako antikoagulans, do 24 hodin od venepunkce a skladovaných při teplotě 18–25 °C. Analýza se provádí do 24 hodin od imunobarvení.

SPECIFICITA

Antigen CD11b je rovněž uváděn pod několika dalšími názvy, tj. integrinový řetězec alfa-M, Mac-1, CR3, iC3bR nebo Mo1 (8, 9). Jde o integrovaný transmembránový glykoprotein typu I o hmotnosti 170–165 kDa za redukujících/neredukujících podmínek. CD11b vykazuje 19 potenciálních N-glykosylačních míst (8).

Exprese řetězce CD11b na buněčném povrchu je podmíněna přítomností antigenu CD18 (také známého jako integrinový řetězec beta2). Společně vytvářejí tyto dvě podjednotky integrin CD11b/CD18, jeden ze čtyř integrinových heterodimerů, které mohou vzniknout spojením beta řetězce CD18 se čtyřmi rozdílnými alfa řetězci CD11. Integrin CD11b/CD18 (αMβ2) se také nazývá Mac-1. Integrin CD11b/CD18 má schopnost vazby široké škály ligandů. Mimo jiné může rozpoznat CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, složku komplementu iC3b, fibrinogen a LPS/LBP (komplex lipopolysacharidu (LPS) a LPS-vázajícího proteinu) (8). Navíc existují důkazy o intramembránových interakcích CD11b/CD18 s GPI-ukotvenými povrchovými molekulami, jako je CD16 nebo CD14 (10). Tyto interakce se mohou podílet na transmembránové signalizaci a efektorových funkcích membránových receptorů navázaných na GPI. CD11b/CD18 je silně exprimován na NK lymfocytech, neutrofilech, monocytech a makrofázích.

Monoklonální protilátka BEAR1 (9) byla přiřazena k molekule CD11b na 6. HLDA semináři o diferenciačních antigenech lidských leukocytů v Kobe v Japonsku roku 1996 (WS kód: A015, část Adhezní molekuly) (8).

PŘESNOST

Procento zbarvení pozitivního cíle bylo stanoveno pomocí dvou vzorků plné krve zpracovaných desetkrát ve stejný den a pomocí stejného cytometru. Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Pozitivní cíl	Číslo	Průměr (%)		SD		CV (%)	
		Dárce 1	Dárce 2	Dárce 1	Dárce 2	Dárce 1	Dárce 2
Lymfocyty CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocyty CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocyty CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

DETEKČNÍ LIMIT

Studie byla vedena v souladu s CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Detekční limit (LOD) je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze konzistentně detekovat. Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Pozitivní cíl	Detekční limit
Lymfocyty CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocyty CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocyty CD11b +	1,0 Cells/ µL

OMEZENÍ TECHNIKY

1. Průtoková cytometrie může generovat falešné výsledky, pokud nebyl cytometr dokonale srovnán, pokud nebyl řádně kompenzován únik fluorescence a pokud nebyly oblasti důkladně napolohovány.
2. Přednostně se doporučuje použití metody lýzy erytrocytů s promývacím krokem, protože tato reagencie nebyla optimalizována pro lyzační metody „bez promytí".
3. Přesné a reprodukovatelné výsledky budete získávat tak dlouho, dokud budou postupy vedeny v souladu s technickým příbalovým letákem a se zásadami správné laboratorní praxe.
4. Konjugovaná protilátka této reagencie je kalibrována tak, aby nabízela co nejlepší poměr specifického a nespecifického signálu. Proto je důležité dodržovat v každém testu poměr objemu reagencie/ vzorku.
5. V případě hyperleukocytózy, nařeďte krev pomocí PBS tak, abyste získali hodnotu přibližně 5 x 10^9 leukocytů/l (2).
6. Za určitých patologických stavů, jako je těžké selhání ledvin nebo hemoglobinopatie, může být lýza erytrocytů pomalá, neúplná nebo dokonce nemožná. V takovém případě se doporučuje před barvením izolovat mononukleární buňky pomocí hustotního gradientu (např. Ficoll) (3).

RŮZNÉ

Příklady a literatura viz příloha.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, stylizované logo, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios a VersaLyse jsou ochranné známky společnosti Beckman Coulter, Inc. a jsou registrovány u USPTO.

Pacific Blue je ochranná známka společnosti Molecular Probes, Inc.

VÝROBCE:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Zákaznické centrum: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Všechna práva vyhrazena.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF **B36296**
50 tests; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Konjugeret antistof

IVD CE

DANSK	Specifikationer
Specificitet	CD11b
Klon	Bear1
Hybridom	SP2/0 x balb/c
Immunogen	Purified human monocytes
Immunoglobulin	IgG1
Art	Mus
Kilde	Ascitesvæske eller supernatant fra in vitro-dyrkede hybridomaceller
Oprensning	Affinitetskromatografi
Fluorokrom	Pacific Blue
Molærforhold	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ-excitation	405 nm
Emissionstop	455 nm
Buffer	PBS pH 7,2 plus 2 mg / mL BSA og 0,1% NaN_3

ANVENDELSE
Dette fluorokrom-konjugerede antistof giver mulighed for at identificere cellepopulationer, som udtrykker det CD11b antigen, der forekommer i humant perifert blod ved hjælp af flowcytometri.

PRINCIP
Denne test er baseret på specifikke monoklonale antistoffers evne til at binde til de antigen-determinanter, som udtrykkes i leukocytter.
Den specifikke farvning af leukocytter udføres ved inkubation af prøven med IOTest-reagenset. De røde blodlegemer fjernes så med lyse, og leukocytterne, som ikke påvirkes af denne proces, analyseres ved flowcytometri.
Flowcytometret måler lysspredning og cellernes fluorescens. Det gør det muligt at afgrænse den pågældende population inden for det elektroniske vindue, der er defineret på et histogram, som er korreleteret til den retvinklede lysspredning (Side Scatter eller SS) spredning af snævervinklet lys (Forward Scatter eller FS). Andre histogrammer, der kombinerer to af de forskellige parametre på cytometret, kan anvendes som hjælp i gating-stadiet afhængigt af den anvendelse, som brugeren vælger.

EKSEMPLER PÅ KLINISKE ANVENDELSER
CD11b er nyttig til påvisning og karakterisering af hæmatologiske lidelser (4-6). CD11b-molekylet udtrykkes i akut monoblastisk leukæmi og akut monocytisk leukæmi. Anormaliteter af CD11b-udtryk har prognostisk betydning i myelodysplastiske syndromer (MDS). Patienter med en lav procent af knoglemarvsceller, der udtrykker CD11b, har en højere risiko for udvikling af myeloid leukemi sammenlignet med patienter med mere end 53 % marvceller, der udtrykker CD11b (4). CD11b kan desuden af og til observeres på T-celle stor granular lymfocyt leukæmi (7).

OPBEVARING OG STABILITET
De konjugerede væskeformer skal holdes mellem 2 og 8°C og beskyttes mod lys før og efter åbningen af hætteglasset.
Stabilitet for lukket hætteglas: se udløbsdatoen på hætteglasset.
Stabilitet for åbnet hætteglas: reagenset er stabilt i 180 dage.

REAGENSINDHOLD
Koncentration: se lot-specifikt analysecertifikat på www.beckmancoulter.com.

EVIDENS PÅ NEDBRYDNING
Enhver ændring i reagensets fysiske udseende kan muligvis in dicere forringelse, og reagenset må ikke anvendes.
I tilfælde af beskadiget emballage, eller hvis de opnåede data viser ydelsesændring, bedes du kontakte din lokale distributør eller benytte følgende e-mail-adresse:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

FORHOLDSREGLER
1. Anvend ikke reagenset efter udløbsdatoen.
2. Må ikke fryses.
3. Lad det opnå rumtemperatur (18 – 25°C) før brug.
4. Minimér eksponering for lys.
5. Undgå mikrobisk kontamination af reagenser, ellers kan der forekomme forkerte resultater.
6. Antistofopløsninger, der indeholder natriumazid (NaN_3) skal håndteres med forsigtighed. Må ikke indtages, og undgå enhver kontakt med huden, slimhinderne og øjnene.
   Natriumazid kan desuden danne potentielt farlig hydrogenacid i et surt miljø. Hvis det skal bortskaffes, anbefales det, at reagenset fortyndes med rigeligt vand, før det hældes i afløbssystemet for at forhindre, at der ophobes natriumazid i metalrør og for at forhindre risikoen for eksplosion.
7. Alle blodprøver skal betragtes som potentielt smittefarlige og skal håndteres med forsigtighed (især: at du bruger beskyttelseshandsker, kittel og beskyttelsesbriller).
8. Pipettér aldrig med munden, og undgå enhver kontakt af prøverne med huden, slimhinderne og øjnene.
9. Blodprøverør og engangsmateriale, som anvendes til håndtering, skal bortskaffes i særlige beholdere til forbrænding.
10. Reagenser og affald skal elimineres i henhold til de lokale krav.

PRØVER
Der skal tages venøse blodprøver ved hjælp af sterile rør, som indeholder EDTA-salt som antikoagulerende middel.
Prøverne skal opbevares ved rumtemperatur (18 – 25°C) og må ikke rystes. Prøverne skal homogeniseres ved at ryste dem let, inden testprøven tages.
Prøverne skal analyseres inden 24 timer efter venepunkturen.

METODE
KRÆVET MATERIALE, SOM IKKE MEDFØLGER
- Prøvetagningsrør og nødvendigt materiale til prøvetagningen.
- Automatiske pipetter med engangsspidser til 10, 100 og 500 µL.
- Hæmolyserør i plast.
- Kalibreringsperler:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Rødt blodlegeme-lysesreagens med vaskestadium efter lyse. For eksempel: VersaLyse (ref. A09777).
- Leukocyt fikseringreagens. For eksempel: IOTest 3-fikseringsopløsning, (ref. A07800).
- Mus Isotypekontrol Pacific Blue: IOTest-reagens (Ref. A74764).
- Buffer (PBS: 0,01 M natriumphosphat; 0,145 M natriumklorid; pH 7,2).
- Centrifuge.
- Automatisk omrører (hvirvel-typen).
- Flowcytometer.

PROCEDURE
Udover testrøret anbefales der et kontrolrør for hver analyseret prøve, hvor blodlegemerne blandes ved tilstedeværelsen af den isotypiske kontrol (ref. A74764).

1. Tilføj 10 µL af specifikt IOTest-konjugeret antistof for hvert testrør og 10 µL af den isotypiske kontrol for hvert kontrolrør.
2. Tilføj 100 µL af testprøven til begge rør. Ryst rørene forsigtigt.
3. Skal inkuberes i 15 til 20 minutter ved rumtemperatur (18 – 25°C), beskyttet mod lys.
4. Udfør derefter lyse af de røde blodlegemer ved at følge henstillingerne til det anvendte lysereagens.
   Hvis du f.eks. ønsker at anvende VersaLyse (ref. A09777), skal du se folderen og fortrinsvis følge proceduren, som kaldes "med konkomitant fiksering", der består i at tilføje 1 mL "Fix-og-Lyse"-blanding, der er forberedt på bestilling. Ryst øjeblikkeligt i et sekund, og inkubér i 10 minutter ved rumtemperatur, beskyttet mod lys.
5. Skal centrifugeres i 5 minutter ved 150 x g ved rumtemperatur.
6. Fjern supernatanten ved aspiration.
7. Resuspendér cellekuglen ved brug af 3 mL PBS.
8. Gentag trin 5.
9. Fjern supernatanten ved aspiration, og resuspendér cellekuglen ved brug af:
   – 0,5 mL PBS plus 0,1 % formaldehyd, hvis præparaterne skal opbevares mindre end

24 timer. (Der kan opnås 0,1 % formaldehyd PBS ved at fortynde 12,5 µL IOTest 3-fikservæske (ref. A07800) ved 10X koncentration i 1 mL PBS).
- 0,5 mL PBS uden formaldehyd, hvis præparaterne skal analyseres inden for 2 timer.

BEMÆRK: opbevar i alle tilfælde præparaterne mellem 2 og 8°C og beskyttet mod lys.

YDELSE

Ydelsesdatatene opnås ved at følge den ovenfor beskrevne procedure på prøver inden for 24 timer efter venepunktur, der er opsamlet i forvejen i sterile rør med EDTA-salt som antikoagulerende middel og opbevaret ved 18 - 25°C. Analysen udføres inden for 24 timer efter immunofarvning.

SPECIFICITET

Der henvises også til CD11b-antigenet under forskellige andre navne, dvs. alfa-M integrinkæde, Mac-1, CR3, iC3bR eller Mo1 (8, 9). Det er en type I integralt transmembrant glykoprotein på 170 – 165 kDa under henholdsvis reducerende/ikke-reducerende betingelser. CD11b viser 19 potentielle N-glykosyleringssteder (8).
CD11b-kædens udtryk på celleoverfladen kræver, at CD18-antigenet er til stede (også kendt som beta2-integrinkæde). Kombinationen af disse to underenheder skaber CD11b-/CD18-integrinet, en af de 4 integrin-heterodimerer, der kan bygges af sammenkædningen af CD18-beta-kæden med 4 karakteristiske CD11 alfa-kæder. CD11b-/CD18- (αMβ2)-integrinet kaldes også Mac-1. CD11b/CD18 integrinet har væsentlige ligandbindende kapaciteter. Det kan genkende CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, komplementkomponent iC3b, fibrinogen og LPS/LBP (lipopolysaccharidkompleks (LPS) og LPS-bindende protein) blandt andre ligander (8). Der er desuden evidens på intramembrane interaktioner af CD11b/CD18 med GPI-forankrede molekyler som f.eks. CD16 eller CD14 (10). Disse interaktioner kan dække transmembransignalering og effektorfunktioner for GPI-sammenkædede membranreceptorer. CD11b/CD18 udtrykkes kraftigt på NK-lymforcytter, neutrofiler, monocytter og makrofager.
BEAR1 monoklonalt antistof (9) blev bundet til CD11b under det 6. HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA-seminar om differentieringsantigener på humane leukocytter) i Kobe, Japan, i 1996 (WS Code: A015, Section Adhesion Molecules) (8).

PRÆCISION

Farvningsprocenten af et positivt mål blev bestemt ved at anvende to helblodsprøver, kørt ti gange og på samme dag ved hjælp af det samme cytometer. I den følgende tabel vises der en oversigt over de opnåede resultater:

Positivt mål	Antal	Middelværdi (%)		SD		CV (Varians-ko-efficient) (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Lymfocytter CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocytter CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocytter CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

DETEKTERINGSGRÆNSE

Der blev foretaget en undersøgelse i henhold til CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Detekteringsgrænsen (LOD) er den laveste koncentration af analyt, der kan detekteres konstant. I den følgende tabel vises der en oversigt over opnåede resultater:

Positivt mål	Detekteringsgrænse
Lymfocytter CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocytter CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocytter CD11b +	1,0 Cells/ µL

TEKNIKKENS BEGRÆNSNINGER

1. Flowcytometri kan give forkerte resultater, hvis cytometeret ikke er perfekt justeret, hvis der ikke er kompenseret korrekt for utætheder af fluorescens, og hvis områderne ikke er omhyggeligt placeret.
2. Det er mest gunstigt at anvende en RBC-lyseteknik med et vasketrin, da dette reagens ikke er optimeret til "ikke-vask"-lyseteknikker.
3. Der opnås nøjagtige og reproducerbare resultater, så længe de anvendte procedurer er i overensstemmelse med den tekniske indlægsseddel og kompatibel med god laboratoriepraksis.
4. Reagensets konjugerede antistof er kalibreret for at give det bedste specifikke signal/ikke-specifikke signalforhold. Det er derfor vigtigt at følge reagensmængde-/prøvemægdeforholdet i hver test.
5. I tilfælde af hyperleukocytose skal blodet fortyndes i PBS for at opnå en værdi på ca 5 x 10^9 leukocytter/L (2).
6. I visse sygdomsstadier som f. eks, alvorlig nyresvigt eller hæmoglobinopati kan lyse af røde blodlegemer være langsom, ufuldstændig eller ligefrem umulig. Det anbefales i dette tilfælde af isolere mononukleære celler ved hjælp af en tæthedsgradient (for eksempel Ficoll) før farvning (3).

DIVERSE

Se tillægget for eksempler og referencer.

HANDELSMÆRKER

Beckman Coulter, det stiliserede logo, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios og VersaLyse er varemærker, tilhørende Beckman Coulter, Inc. og er registreret i USPTO.

Pacific Blue er et varemærke, tilhørende Molecular Probes, Inc.

PRODUCERET AF:

IMMUNOTECH SAS
En Beckman Coulter-virksomhed
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Kundeservice: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Alle rettigheder forbeholdes.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 teszt; 0,5 mL
10 µL / teszt

IOTest
Konjugált Antitest

IVD

CE

MAGYAR	Specifikációk
Specifitás	CD11b
Klón	Bear1
Hibridóma	SP2/0 x balb/c
Immunogén	Purified human monocytes
Immunglobulin	IgG1
Faj	Egér
Forrás	In vitro tenyésztett hibridoma sejtekhez tartozó ascites folyadék vagy felülúszó
Tisztítás	Affinitás kromatográfia
Fluorokróm	Pacific Blue
Molarány	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ gerjesztés	405 nm
Emissziós csúcs	455 nm
Puffer	PBS pH 7,2 plusz 2 mg / mL BSA és 0,1% NaN_3

HASZNÁLAT
Ez a fluorokróm-konjugált antitest lehetővé teszi az emberi periferikus vérben jelen lévő CD11b antigént kimutató sejtpopuláció azonosítását áramlási citometria használatával.

MŰKÖDÉSI ELV
Ez a teszt bizonyos monoklonális antitestek azon képességén alapul, hogy azok kötést alakítanak ki a leukociták által kimutatott antigén determinánsokkal.
A leukociták sajátos festése úgy jön létre, hogy a mintát az IOTest reagensével inkubálni kell. A vörös sejteket ezt követően a lízis eltávolítja, és a leukociták, melyekre a folyamat nem hat, így elemezhetővé válnak áramlási citometriával. Az áramlási citométer a fényszórást és a sejtek fluoreszcenciáját méri. Ez lehetővé teszi a releváns populáció elhatárolását a hisztogram által meghatározott elektronikus ablakon belül, mely egymáshoz viszonyítja a fény ortogonális diffúzióját (Side Scatter vagy SS) és a szűk szögő fény diffúzióját (Forward Scatter vagy FS). Más, a citométeren elérhető két különböző paramétert kombináló hisztogramok is használhatóak támogatásként a szűrési szakaszban, a felhasználó által választott alkalmazástól függően.

PÉLDÁK A KLINIKAI ALKALMAZÁSRA
A CD11b hasznos a hematológiai rendellenességek felderítésénél és jellemzésénél (4-6). A CD11b molekula kimutatható az akut monoblasztos leukémiánál és az akut monocitikus leukémiánál. A CD11b kimutatási rendellenességei prognosztikai jelentőséggel bírnak a mielodisplasiás szindrómánál (MDS). Azoknál a betegeknél, akik csontvelő-sejtjei alacsony százalékban mutatnak CD11b-t, nagyobb a veszélye az akut mieloid leukémia kialakulásának, mint azoknál, akiknek a velősejtjeinek több mint 53%-ánál mutatható ki a CD11b (4). Ezen felül a CD11b-t néha meg lehet figyelni a T sejtes nagy granulás limfocita leukémia esetében is (7).

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS
A konjugált folyadékot 2 és 8°C között kell tartani, vigyázni kell rá, hogy ne érje fény, sem az ampulla kinyitása előtt, sem azután.
Lezárt ampulla stabilitása: lásd a lejárati dátumot az ampullán.
Felnyitott ampulla stabilitása: a reagens 180 napon át stabil.

A REAGENSEK TARTALMA
Koncentráció: Lásd a tételspecifikus Elemzési Bizonyítványt (Certificate of Analysis) a www.beckmancoulter.com oldalon.

AZ ELBOMLÁS JELEI
A reagensek fizikai kinézetének változása romlást jelezhet, ebben az esetben a reagenst nem szabad használni.
Ha a csomagolás sérült, vagy ha a visszakapott adatok a teljesítmény változását mutatják, kérjük, vegye fel a kapcsolatot helyi terjesztőjével, vagy írjon a következő email címre: immuno-techsup@beckmancoulter.com

ÓVATOSSÁGI INTÉZKEDÉSEK
1. Ne használja a reagenst a lejárati dátumot követően.
2. Tilos fagyasztani.
3. Használat előtt a reagens érje el a szobahőmérsékletet (18 – 25°C).
4. Ne tegye ki fény hatásának.
5. Kerülje el a reagensek mikrobiális fertőzését, mert az hibás eredményekhez vezethet.
6. A nátrium-azidot (NaN_3) tartalmazó antitest oldatokat óvatosan kell kezelni. Ne nyelje le, és kerülje a bőrrel, a nyálkahártyával vagy a szemekkel való érintkezést.
   Ezen felül savas környezetben a nátrium-azid veszélyes hidrazonsavat alkothat. Eltávolításnál javasoljuk, hogy a reagenst oldja fel nagy mennyiségű vízben, mielőtt kiönti azt a lefolyóba, így elkerülhető a nátrium-azid felhalmozódása a fémcsövekben, és a robbanás veszélye is.
7. Minden vérminta potenciálisan fertőzőként kezelendő, és ezért óvatosan kell kezelni (különösen fontos: védőkesztyű, -ruha és -szemüveg viselete).
8. Sose pipettázzon a szájnál, és kerülje az érintkezést a bőrrel, a nyálkahártyával és a szemmel.
9. A kezelés során használt véres csöveket és más eldobható anyagokat ad hoc tárolókba kell dobni, ezeket később el kell égetni.
10. A reagenseket és a hulladékot a helyi szabályozásnak megfelelően kell elpusztítani.

MINTÁK
A vénás vért steril, antikoagulánsként EDTA-sót tartalmazó csövek segítségével kell levenni.
A mintákat szobahőmérsékleten (18 – 25°C) kell tárolni, és nem szabad megrázni. A mintákat gyengéd agitációval kell homogenizálni a tesztminta levétele előtt.
A mintákat a véna megszúrását követő 24 órában elemezni kell.

ELJÁRÁSI MÓD
NEM SZALLITOTT, SZÜKSEGES ANYAGOK
- A mintavételhez szükséges mintavevő csövek és eszközök.
- Eldobható végű automatikus pipetták a 10 érdekében, 100 és 500 µL.
- Műanyag hemolízis csövek.
- Kalibráló gyöngyök:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Vörös sejt lízis reagens mosási fázissal a lízis után. Például: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leukocita fixáló reagens. Például: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Egér Izotipikus kontrol Pacific Blue: IOTest reagens (Ref. A74764).
- Puffer (PBS: 0,01 M nátrium-foszfát; 0,145 M nátrium-klorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatikus agitátor (Vortex típusú).
- Áramlási citométer.

ELJÁRÁS
Minden egyes elemzett mintánál a teszt csövön kívül javasolt egy kontroll cső használata is, melyben a sejteket izotípus kontroll jelenlétében keverik (Ref. A74764).

1. Adjon 10 minden teszt csőhöz µL specifikus IOTest konjugált antitestet, majd 10 µL izotípus kontrollt minden egyes kontroll csőhöz.
2. Adjon 100 µL-t a tesztmintából mindkét csőhöz. Gyengéden vortexelje a csöveket.
3. Inkubálja 15-20 percig szobahőmérsékleten (18 – 25°C), fénytől védett helyen.
4. Aztán végezze el a vörös sejtek lízisét, követve a használt lízis reagens útmutatását.
   Ha például a VersaLyse (Ref. A09777) használatát tervezi, vegye elő a tájékoztatót és kövesse a "egyidejű fixálással" elnevezésű procedúrát, mely 1 mL azonnal elkészíthető "Fix-and-Lyse" keverék hozzáadásából áll. Vortexelje azonnal egy másodpercig, majd inkubálja 10 percig szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen.
5. Centrifugázza 5 percig 150X-es fordulatszámmal szobahőmérsékleten.
6. Távolítsa el a felületen lebegő anyagokat.
7. Reszuszpendálja a sejteket 3 mL foszfátpufferelt sóoldat (PBS) használatával.
8. Ismételje meg az 5-ös lépést.
9. Távolítsa el a felületen lebegő anyagokat és reszuszpendálja a sejteket a következők segítségével:

– 0,5 mL-nyi PBS plusz 0,1% formaldehid ha a preparátumot csak kevesebb mint óráig szeretné megtartani 24.(A 0,1% formaldehid PBS megkapható 12,5 µL IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) 10-szeres koncentráción történő hígításával 1 mL PBS-ben).

- 0,5 mL PBS formaldehid nélkül, ha a preparátumot 2 órán belül elemezni fogja.

MEGJEGYZÉS: A preparátumot minden esetben tartsa 2 és 8°C között, fénytől védett helyen.

TELJESÍTMÉNY

A teljesítményadatokat a fent leírt folyamat segítségével lehet megkapni a korábban steril, antikoagulánsként EDTA-sót tartalmazó csövekbe levett és 18-25°C-on tárolt mintákból a véna megszúrását követő 24 órán belül. Az elemzést az immunofestést követő 24 órán belül kell elvégezni.

SPECIFIKUS HATÁS

A CD11b antigénre számos más néven is utalnak, pl. alfa-M integrin lánc, Mac-1, CR3, iC3bR, vagy Mo1 (8, 9). Ez egy I-es típusú szerves transzmembrános glikoprotein, molekulatömege 170 - 165 kDa, redukált/nem redukált körülmények között, ebben a sorrendben. A CD11b 19 potenciális N-glikozilációs helyet mutat (8).
A CD11b lánc sejtfelszínen történő kimutatásához az szükséges, hogy jelen legyen a CD18 antigén (más néven béta2 integrin lánc). Ez a két alegység együtt alkotja a CD11b/CD18 integrint, mely azon 4 integrin heterodimer egyike, melyeket fel lehet építeni a CD18 béta lánc és 4 különböző CD11 alfa lánc segítségével. A CD11b/CD18 (αMβ2) integrint Mac-1-nek is nevezik. A CD11b/CD18 integrin széleskörű ligand-kötő képességekkel rendelkezik. Képes felismerni a CD23-at, a CD54-et (ICAM-1),a CD102-t (ICAM-2), az ICAM-4-et, az iC3b kiegészítő komponenst, a fibrinogént, és a LPS/LBP-t (lipopoliszacharid (LPS) és LPS-kötő fehérje komplexe), más ligandumok között (8). Ezen felül bizonyíték van arra is, hogy a CD11b/CD18 intramembrán interakcióba lép GPI-horgonyzott felszíni molekulákkal, mint amilyen például a CD16 vagy a CD14 (10). Ezek az interakciók megmagyarázhatják a GPI-kapcsolt membrán-receptoroknál a transzmembrán jelzéseket és az effektor funkciókat. A CD11b/CD18 igen jól kimutatható az NK limfocitákon, a neutrofileken, a monocitákon és a makrofágokon.
A BEAR1 monoklonális antitestet (9) a CD11b-hez rendelték a 6 HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Műhely az emberi leukocita differenciálódási antigénekről) során, melyet Kobe-ben, Japánban, 1996-ban tartottak (WS kód: A015, Adhéziós molekulák szekció) (8).

PONTOSSÁG

A pozitív célpont festési százalékot két teljes vérminta segítségével állapították meg, melyet tíz másodpéldányon is átfuttattak, ugyanaznap és ugyanazon citométer használatával. Az eredményeket a következő táblázat tartalmazza:

Pozitív célpont	szám	Mean (Közép) (%)		SD		CV (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Limfociták CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monociták CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulociták CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

KIMUTATHATÓSÁGI KÜSZÖB

A kutatást a következőnek megfelelően végeztük: CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). A Kimutathatósági küszöb (LOD) az a legkisebb koncentrációjú analit, melyet konzisztensen ki lehet mutatni. Az eredményeket a következő táblázat foglalja össze:

Pozitív célpont	Kimutathatósági küszöb
Limfociták CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monociták CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulociták CD11b +	1,0 Cells/ µL

A MÓDSZER KORLÁTAI

1. Az áramlási citometria hamis adatokat adhat vissza, ha a citométert nem megfelelően állították be, ha a fluoreszcencia-szivárgásokat nem kompenzálták megfelelően, vagy ha a régiókat nem megfelelően pozicionálták.
2. Kívánatos RBC lízis módszer használata, mely mosási lépést is tartalmaz, mivel jelen reagenst nem optimalizálták "mosás nélküli" lízis módszerekhez.
3. Pontos és megismételhető eredmények születnek abban az esetben, ha a felhasználók követik a technikai útmutató utasításait és a jó laboratóriumi gyakorlatot.
4. Jelen reagens konjugált antitestét úgy kalibrálták, hogy a legjobb specifikus jelzés/nem-specifikus jelzés arányt érje el. Ezért minden teszt esetén követni kell az ajánlott reagens mennyiség/minta mennyiség arányt.
5. Hyperleucocytosis esetén PBS-ben hígítsa fel a vért addig, amíg el nem éri a körülbelül 5 x 10^9 leukocita/L értéket (2).
6. Bizonyos betegségi állapotok, például súlyos veseelégtelenség vagy hemoglobinopátiák esetén a vörös sejtek lízise lassúvá, tökéletlenné vagy lehetetlenné válhat. Ebben az esetben javasolt egymagvú sejtek elkülönítése egy sűrűségi gradiens segítségével (például Ficoll) még a festés előtt (3).

EGYÉB

Lásd a Függeléket példákért és referenciákért.

VÉDJEGYEK

A Beckman Coulter, a stilizált logó, a a Flow-Check, a Flow-Set, az IOTest, a Navios, a és az VersaLyse a Beckman Coulter, Inc., bejegyzett és USPTO-nál regisztrált védjegyei.

A Pacific Blue a Molecular Probes, Inc. védjegye.

GYÁRTVA:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter csoport tagja
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Ügyfélszolgálat: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Minden jog fenntartva.

IOTest

CD11b-Pacific Blue

REF B36296

50 определений; 0,5 мл
10 мкл / определение

IOTest
Конъюгированное антитело

IVD CE

РУССКИЙ	Спецификации
Специфичность	CD11b
Клон	Bear1
Гибридома	SP2/0 x balb/c
Иммуноген	Purified human monocytes
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Источник	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, льтивированных in vitro
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
Молярная концентрация	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ возбуждения	405 нм
Пик эмиссии	455 нм
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN_3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Это конъюгированное с флуорохромом антитело позволяет проводить идентификацию популяций клеток, экспрессирующих CD11b антиген, присутствующий в человеческой периферической крови, с использованием проточной цитометрии.

ПРИНЦИП

Этот анализ основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, экспрессируемыми лейкоцитами.

Специфическое окрашивание лейкоцитов осуществляется путем инкубации образцов реагентом IOTest. Эритроциты лизируются и удаляются из пробы, после чего методом проточной цитометрии проводится анализ лейкоцитов, не затронутых процессом лизиса.

Проточный цитометр измеряет степень светорассеяния и флуоресценции клеток. Это позволяет выделить интересующую популяцию клеток в пределах электронного окна, определенного на гистограмме корреляции различных параметров ортогонального светорассеяния (боковое рассеяние или SS) и рассеяния света под узким углом (прямое рассеяние или FS). На стадии селекции клеток в качестве вспомогательных могут также использоваться имеющиеся на цитометре двухпараметрические гистограммы в зависимости от способа применения, выбранного пользователем.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

CD11b полезен для выявления и определения нарушений со стороны кроветворной системы (4-6). Молекула CD11b экспрессируется при остром монобластном лейкозе и остром моноцитарном лейкозе. Аномалии экспрессии CD11b имеют прогностическое значение при миелодиспластических синдромах (MDS). Пациенты с низким процентом клеток костного мозга, экспрессирующих CD11b, подвержены более высокому риску эволюции в острый миелоидный лейкоз по сравнению с пациентами, у которых более 53% клеток костного мозга экспрессируют CD11b (4). Кроме того, CD11b иногда наблюдается на Т-клетках лейкоза больших гранулярных лимфоцитов (7).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Конъюгированные жидкие формы должны храниться при температуре от 2 до 8°C в месте, защищенном от света, до и после открытия флакона.

Стабильность закрытого флакона: см. дату срока годности на флаконе.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

СОСТАВ РЕАГЕНТА

Концентрация: См. Сертификат анализа на специфичную партию на www.beckmancoulter.com.

ПРИЗНАК РАЗРУШЕНИЯ

Любые изменения физических свойств реагентов могут сви детельствовать о разрушении; в этом случае реагент использовать нельзя.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реагент после истечения срока годности.
2. Не замораживать.
3. Перед использованием доведите до комнатной температуры (18 – 25°C).
4. Минимизируйте воздействие света.
5. Избегайте микробного загрязнения реагентов, в противном случае возможно получение неверных результатов.
6. Следует осторожно обращаться с растворами антител, содержащими азид натрия (NaN_3). Не принимайте их внутрь и избегайте любого попадания на кожу, слизистые оболочки и в глаза. Кроме того, в кислотной среде азид натрия может образовать потенциально опасную азотоводородную кислоту. При необходимости его утилизации реагент рекомендуется растворить в большом количестве воды, прежде чем выливать в канализацию, чтобы избежать накопления азида натрия в металлических трубах и предотвратить риск взрыва.
7. Все образцы крови необходимо считать потенциально инфекционными, поэтому с ними следует обращаться с осторожностью (в частности, надевать защитные перчатки, халаты и очки).
8. Ни в коем случае не пипетируйте ртом и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.
9. Пробирки для крови и одноразовые материалы, используемые при работе, необходимо утилизировать в специальных контейнерах, предназначенных для сжигания.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

ПРОБЫ

Венозную кровь необходимо собирать с помощью стерильных пробирок, содержащих соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Образцы необходимо хранить при комнатной температуры (18 – 25°C); не встряхивайте их. Перед взятием образца для анализа пробы необходимо гомогенизировать с помощью мягкого перемешивания.

Пробы необходимо анализировать в течение 24 часов после венопункции.

МЕТОДОЛОГИЯ

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ НЕ ПОСТАВЛЯЮТСЯ

- Пробирки для взятия образцов и материалы, необходимые для взятия образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 10, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Контрольные события для калибровки:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493).
- Реагент для лизиса эритроцитов со стадией промывания после лизиса. Например: VersaLyse (№ A09777).
- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: Фиксирующий раствор IOTest 3 (№ A07800).
- Мышь Изотипический контроль Pacific Blue:
  Реактив IOTest (Ref. A74764).
- Буфер (PBS: 0,01 M фосфата натрия; 0,145 M хлорида натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматическое перемешивающее устройство (вращательного типа).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

Для каждого анализируемого образца рекомендуется, помимо пробирки для анализа, использовать контрольную пробирку, в которой клетки перемешиваются в присутствии изотипического контроля (№ A74764).

1. Добавьте 10 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 10 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. Добавьте 100 мл образца для анализа в обе пробирки. Аккуратно вращайте пробирки.
3. Инкубируйте на протяжении 15 - 20 минут при комнатной температуре (18 - 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем выполните лизис эритроцитов, соблюдая рекомендации для используемого реагента для лизиса.
   Например, если вы желаете использовать VersaLyse (№ A09777), обратитесь к брошюре и предпочтительно следуйте процедуре, озаглавленной «с сопутствующей фиксацией», которая заключается в добавлении 1 мл смеси Fix-and-Lyse, подготовленной экстемпорально. Немедленно перемешайте в течение одной секунды и инкубируйте на протяжении 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
5. Центрифугируйте в течение 5 минут при 150 x g при комнатной температуре.
6. Удалите супернатант с помощью аспирации.
7. Перерастворите клеточную массу с помощью 3 мл PBS.
8. Повторите шаг 5.

9. Удалите супернатант путем аспирации и перерастворите клеточную массу, используя:
   – 0,5 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты будут храниться менее 24 часов. (0,1% формальдегида в PBS можно получить, разведя 12,5 мл фиксирующего раствора IOTest 3 (№ A07800) концентрации 10X в 1 мл PBS).
   – 0,5 мл PBS без формальдегида, если препараты будут анализироваться в течение 2 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Всегда храните препараты при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

ПОКАЗАТЕЛЬ

Показатели по эффективности получены с помощью описанной выше процедуры на образцах, проанализированных в течение 24 часов после венопункции, собранных ранее в стерильные пробирки с солью ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранимых при 18–25°C. Анализ выполнялся в течение 24 часов после иммуноокрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Антиген CD11b также имеет несколько других названий, например интегриновая цепь alpha-M, Mac-1, CR3, iC3bR или Mo1 (8, 9). Он представляет собой интегральный трансмембранный гликопротеин типа I на 170 – 165 kDa в восстановительных/невосстановительных условиях соответственно. CD11b демонстрирует 19 потенциальных центров N-гликолизирования (8).

Экспрессия цепи CD11b на поверхности клетки требует присутствия антигена CD18 (также известного как интегриновая цепь beta2). Эти две субъединицы сочетаются и создают интегрин CD11b/CD18, один из 4 интегриновых гетеродимеров, которые можно построить путем ассоциации бета-цепи CD18 с 4 отличительными альфа-цепями CD11. Интегрин CD11b/CD18 (αMβ2) также называется Mac-1. Интегрин CD11b/CD18 имеет широкие возможности связывания лигандов. Он может распознавать CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, компонент комплемента iC3b, фибриноген и LPS/LBP (комплекс липосахарида (LPS) и белок, связывающий LPS) среди других лигандов (8). Кроме того, существуют признаки внутримембранного взаимодействия CD11b/CD18 с такими связанными с GPI поверхностными молекулами, как CD16 или CD14 (10). Эти взаимодействия могут обеспечивать трансмембранные сигналы и функции эффектора связанных с GPI рецепторов мембраны. CD11b/CD18 сильно выражается на NK-лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах и макрофагах.

Моноклональное антитело BEAR1 (9) было отнесено к CD11b во время 6-го семинара HLDA по вопросам дифференцирующих антигенов лейкоцитов человека в Кобе, Япония, в 1996 году (код WS: A015, секция адгезивных молекул) (8).

ТОЧНОСТЬ

Процентные значения положительно окрашенных клеток определялись по двум образцам взятой в день анализа цельной крови с десятью повторами использованием одного и того же цитометра. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Положительно окрашенные клетки	Число	Mean (Среднее значение) (%)		SD		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоциты CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Моноциты CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Гранулоциты CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Было проведено исследование в соответствии с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Предел обнаружения (LOD) – это минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно выявлять. Полученные результаты приведены в таблице ниже:

Положительно окрашенные клетки	Предел обнаружения
Лимфоциты CD11b +	2,0 Cells/ µL
Моноциты CD11b +	2,0 Cells/ µL
Гранулоциты CD11b +	1,0 Cells/ µL

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Проточная цитометрия может дать неверные результаты в случае неправильного расположения цитометра, отсутствия верной компенсации утечек флуоресценции и неправильного расположения областей.
2. Предпочтительнее использовать метод лизиса RBC с этапом промывания, поскольку этот реагент не оптимизирован для использования техники лизиса без промывания.
3. Точность и воспроизводимость результатов обеспечивается до тех пор, пока применяемые процедуры используются в соответствии с технической брошюрой и надлежащей лабораторной практикой.
4. Конъюгированное антитело этого реагента калибруется таким образом, чтобы обеспечить наилучшее соотношение специфичного/ неспецифичного сигнала. Поэтому важно соблюдать соотношение объема реагента и образца при проведении каждого анализа.
5. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5 x 10^9 лейкоцитов/л (2).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (3).

РАЗНОЕ

См. примеры и ссылки в Приложении.

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios и VersaLyse являются торговыми марками компании Beckman Coulter, Inc. и зарегистрированы в Бюро по патентам и товарным знакам США (USPTO).

Pacific Blue является товарным знаком компании Molecular Probes, Inc.

ПРОИЗВЕДЕНО КОМПАНИЕЙ:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Обслуживание клиентов: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 test; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Konjuge Antikor

IVD

CE

TÜRKÇE	Spesifikasyonlar
Özgünlük	CD11b
Klon	Bear1
Hibridoma	SP2/0 x balb/c
İmmunogen	Purified human monocytes
İmmunoglobulin	IgG1
Türler	Fare
Kaynak	Asit sıvısı veya in vitro kültürlenmiş hibridoma hücrelerden süpernatant
Saflaştırma	Afinite Kromatografisi
Florokrom	Pacific Blue
Mol Oranı	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ uyarılma	405 nm
Emisyon piki	455 nm
Tampon	PBS pH 7,2 ve 2 mg / mL BSA ve %0,1 NaN_3

KULLANIM
Bu florokrom konjüge antikor akış sitometrisi kullanılarak insan periferal kanında CD11b antijenini ifade eden hücre popülasyonlarının tanımlanmasını mümkün kılar.

PRENSİP
Bu test spesifik monoklonal antikorların lökositler tarafından ifade edilen antijenik determinanlara bağlanma yeteneğini temel alır.
Lökositlerin spesifik boyanması örneğin IOTest reaktifleriyle inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir. Sonra kırmızı hücreler lizis ile çıkarılır ve bu süreçten etkilenmeyen lökositler akış sitometrisiyle analiz edilir.
Akış sitometresi ışık difüzyonu ve hücrelerin floresansını ölçer. İlgilenilen popülasyonun ortogonal ışık difüzyonu (Yan Saçılım veya SS) ve dar açılı ışık difüzyonu (İleri Saçılım veya FS) korelasyonuyla bir histogram üzerinde tanımlanmış elektronik bir pencere içinde ayırt edilmesini mümkün kılar. Sitometrede bulunan farklı parametrelerden ikisini kombine eden başka histogramlar kullanıcının seçtiği uygulamaya bağlı olarak geçitlendirme evresinde destek olarak kullanılabilir.

KLİNİK UYGULAMALAR ÖRNEĞİ
CD11b hematolojik bozuklukların saptanması ve karakterizasyonu için faydalıdır (4-6). CD11b molekülü akut monoblastik lösemi ve akut monositik lösemide ifade edilir. CD11b ifadesinin myelodisplastik sendromlarda (MDS) prognostik önemi vardır. Daha düşük yüzdede kemik iliği hücresinin CD11b ifade ettiği hastalarda kemik iliği hücrelerinin %53'ünden fazlasının CD11b ifade ettiği hastalara göre akut myeloid lösemiye geçme riski daha yüksektir (4). Ayrıca, CD11b bazen T hücreli büyük granüler lenfositik lösemide görülebilir (7).

SAKLAMA VE STABİLİTE
Konjüge sıvı flakonun açılmasından önce ve sonra 2 ile 8°C arasında tutulmalı ve ışıktan korunmalıdır.
Kapalı flakon stabilitesi: flakondaki sonra kullanma tarihine bakınız.
Açık flakon stabilitesi: reaktif 180 gün stabildir.

REAKTİF İÇERİKLERİ
Konsantrasyon: www.beckmancoulter.com adresindeki lota spesifik Analiz Belgesine bakınız.

BOZULMA İŞARETİ
Reaktiflerin fiziksel görünümündeki herhangi bir değişiklik bozulmaya işa ret edebilir ve reaktif kullanılmamalıdır.
Paketleme bozulması durumunda veya elde edilen veriler performansta biraz değişiklik gösteriyorsa lütfen yerel distribütörünüzle irtibat kurun veya şu e-posta adresini kullanın: immuno-techsup@beckmancoulter.com

ÖNLEMLER
1. Reaktifi son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
2. Dondurmayın.
3. Kullanımdan önce oda sıcaklığına (18 – 25°C) gelmesini bekleyin.
4. Işığa maruz kalmamasına dikkat edin.
5. Reaktiflerin mikrobiyel kontaminasyonundan kaçının yoksa hatalı sonuçlar alınabilir.
6. Sodyum azit (NaN_3) içeren antikor solüsyonları dikkatli kullanılmalıdır. Yutmayın ve cilt, mukoza ve gözlerle tüm temastan kaçının.
   Ayrıca asit bir ortamda sodyum azit tehlikeli olabilen hidrazoik asidi oluşturabilir. Eğer atılması gerekiyorsa reaktifin drenaj sistemine dökülmeden önce metal borularda sodyum azit birikmesinden kaçınmak ve patlama riski oluşmasını önlemek için büyük hacimde suyla seyreltilmesi önerilir.
7. Tüm kan örnekleri enfeksiyöz olabilirmiş gibi kabul edilmeli ve dikkatli muamele edilmelidir (özellikle: koruyucu eldivenler, giysiler ve gözlüklerin kullanılması).
8. Asla ağzınızla pipetlemeyin ve örneklerin cilt, mukoza ve gözlerle tüm temasından kaçının.
9. Muamele için kullanılan tek kullanımlık malzeme ve kan tüpleri yakma amaçlı geçici kaplarda atılmalıdır.
10. Reaktifler ve atık yerel gerekliliklere göre ortadan kaldırılmalıdır.

ÖRNEKLER
Venöz kan antikoagülan olarak EDTA tuzu içeren steril tüpler kullanılarak alınmalıdır.
Örnekler oda sıcaklığında (18 – 25°C) tutulmalı ve sallanmamalıdır. Örnekler test örneği alınmadan önce hafif ajitasyonla homojenize edilmelidir.
Örnekler ven ponksiyonundan sonraki 24 saat içinde analiz edilmelidir.

METODOLOJİ
SAGLANMAYAN GEREKLI MATERYAL
- Örnek alma için gerekli materyal ve örnekleme tüpleri.
- 10 için tek kullanımlık uçlara sahip otomatik pipetler, 100 ve 500 µL.
- Plastik hemoliz tüpleri.
- Kalibrasyon boncukları:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493).
- Lizisten sonra yıkama evreli eritrosit lizis reaktifi. Örneğin: VersaLyse (Ref. A09777).
- Lökosit fiksasyon reaktifi. Örneğin: IOTest 3 Fiksatif Solüsyonu (Ref. A07800).
- Fare İzotipik kontrol Pacific Blue: IOTest reaktifi (Ref. A74764).
- Tampon (PBS: 0,01 M sodyum fosfat; 0,145 M sodyum klorür; pH 7,2).
- Santrifüj.
- Otomatik ajitatör (Vorteks tipi).
- Akış sitometresi.

PROSEDÜR
Analiz edilen her örnek için test tüpüne ilaveten hücrelerin izotipik kontrol (Ref. A74764) varlığında karıştırıldığı bir kontrol tipi önerilir.
1. Her test tüpüne 10 µL spesifik IOTest konjüge antikor ekleyin ve her kontrol tüpüne 10 µL izotipik kontrol ekleyin.
2. Her iki tüpe 100 µL test örneği ekleyin. Tüpleri yavaşça vorteksleyin.
3. Işıktan koruyarak oda sıcaklığında (18 – 25°C) 15 - 20 dakika boyunca inkübe edin.
4. Sonra eritrositlerin lizisini kullanılan lizis reaktifinin önerilerini izleyerek yapın.
   Örneğin, VersaLyse (Ref. A09777) kullanmak istiyorsanız broşüre başvurun ve tercihen başka zamanda hazırlanmış 1 mL "Fix-and-Lyse" (Sabitle ve Lizis) karışımının eklenmesinden oluşan "eş zamanlı fiksasyonla" denen işlemi izleyin. Hemen bir saniye vorteksleyin ve ışıktan korunmuş olarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edin.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 150 x g hızında santrifüjleyin.
6. Süpernatanı aspirasyonla alın.
7. Hücre pelletini 3 mL PBS içinde yeniden süspanse edin.
8. Adım 5'i tekrarlayın.
9. Süpernatanı aspirasyonla alın ve hücre pelletini aşağıdakileri kullanarak tekrar süspanse edin:

– 0,5 mL PBS artı %0,1 formaldehid eğer preparatlar 24 saat altında tutulacaksa. (A %0,1 formaldehid PBS 12,5 µL IOTest 3 Fiksatif Solüsyonu (Ref. A07800) 10X konsantrasyonunu 1 mL PBS ile seyrelterek elde edilebilir).
– 0,5 mL PBS formaldehidsiz preparatlar 2 saat içinde analiz edilecekse.

NOT: Her durumda preparatları ışıktan korunmuş olarak 2 ile 8°C arasında tutun.

PERFORMANS

Performans verileri yukarıda tanımlanan işlemin ven ponksiyonundan sonraki 24 saat içinde daha önce antikoagülan olarak EDTA tuzu kullanılarak steril tüplere toplanmış ve 18-25°C'de saklanmış örnekler üzerinde kullanılmasıyla elde edilmiştir. Analiz immün boyama sonrasındaki 24 saat içinde yapılır.

ÖZGÜLLÜK

CD11b antijeninin alfa-M integrin zinciri, Mac-1, CR3, iC3bR veya Mo1 gibi çeşitli başka adları da vardır (8, 9). Sırasıyla redükleyici olan/olmayan şartlar altında 170 – 165 kDa bir tip I entegral transmembran glikoproteindir. CD11b 19 potansiyel N-glikosilasyon bölgesi gösterir (8).

CD11b zincirinin hücre yüzeyinde ifade edilmesi CD18 antijeninin (beta2 integrin zinciri olarak da bilinir) bulunmasını gerektirir. Bu iki alt birim birlikte, CD18 beta zincirinin 4 farklı CD11 alfa zinciriyle birleşmesi ile oluşabilen 4 integrin heterodimerinden biri olan CD11b/CD18 integrinini oluştururlar. CD11b/CD18 (αMβ2) integrinine Mac-1 de denir. CD11b/CD18 integrininin geniş ligand bağlama kapasitesi vardır. CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, kompleman bileşeni iC3b, fibrinojen ve LPS/LBP (lipopolisakkarid (LPS) ve LPS bağlayıcı protein kompleksi) maddelerini ve diğer ligandları tanıyabilir (8). Ayrıca CD11b/CD18'in CD16 veya CD14 gibi GPI ankorlu yüzey molekülleriyle membran içi etkileşimleri konusunda bulgular vardır (10). Bu etkiler GPI bağlantılı membran reseptörlerinin transmembran sinyalleme ve efektör işlevlerinden sorumlu olabilir. CD11b/CD18, doğal öldürücü NK lenfositler, nötrofiller, monositler ve makrofajlarda yüksek derecede ifade edilir.

BEAR1 monoklonal antikoru (9) 1996 yılında Japonya'da Kobe'de yapılan 6. İnsan Lökosit Diferansiyasyon Antijenleri üzerine HLDA Çalışma Grubunda CD11b'ye tahsis edilmiştir (WS Kodu: A015, Bölüm Adezyon Molekülleri) (8).

KESİNLİK

Bir pozitif hedefin boyanma yüzdesi aynı gün ve aynı sitometre kullanılarak on replikat halinde çalışılan iki tam kan örneğiyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Pozitif Hedef	Sayı	Ortalama (%)		SD		CV (%)	
		Donör 1	Donör 2	Donör 1	Donör 2	Donör 1	Donör 2
Lenfositler CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monositler CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granülositler CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

TESPİT LİMİTİ

Uyarınca bir çalışma yapılmıştır CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Tespit Limiti (LOD) analitik tutarlı olarak saptanabilen en düşük konsantrasyonudur. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Pozitif Hedef	Tespit Limiti
Lenfositler CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monositler CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granülositler CD11b +	1,0 Cells/ µL

TEKNİK SINIRLAMALARI

1. Akış sitometrisi eğer sitometre kusursuz şekilde hizalanmamışsa, floresans sızıntıları doğru şekilde dengelenmemişse ve bölgeler dikkatle konumlandırılmamışsa yanlış sonuçlara yol açabilir.
2. Bu reaktif "yıkamasız" lizis teknikleri için optimize edilmediğinden yıkama adımlı bir eritrosit lizis tekniği kullanılması tercih edilir.
3. Kullanılan işlemler teknik prospektüse göre ve iyi laboratuvar uygulamalarıyla uyumlu olduğu sürece doğru ve tekrar üretilebilir sonuçlar elde edilecektir.
4. Bu reaktifin konjüge antikoru en iyi spesifik sinyal / non spesifik sinyal oranını sağlayacak şekilde kalibre edilmiştir. Bu nedenle her testte reaktif hacmi/örnek hacmi oranına bağlı kalmak önemlidir.
5. Hiperlökositoz durumunda kanı PBS ile yaklaşık 5 x 10^9 lökosit/L (2) elde edecek şekilde seyreltin.
6. Şiddetli böbrek yetmezliği veya hemoglobinopatiler gibi bazı hastalık durumlarında eritrosit lizisi yavaş, eksik ve hatta imkansız olabilir. Bu durumda mononükleer hücreleri boyama öncesinde bir dansite gradiyenti (örneğin Ficoll) kullanılarak ayırmak önerilir (3).

ÇEŞİTLİ

Örnekler ve referanslar için Ek kısmına bakınız.

TİCARİ MARKALAR

Beckman Coulter, özel tarzda logosu, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios ve VersaLyse Beckman Coulter, Inc. ticari markalarıdır ve USPTO'da tescillidir.

Pacific Blue, bir Molecular Probes, Inc. ticari markasıdır.

ÜRETİCİ:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Müşteri Hizmetleri: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Tüm Hakları Saklıdır.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 testów; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Sprzężone przeciwciało

IVD CE

POLSKI	Specyfikacja
Swoistość	CD11b
Klon	Bear1
Hybrydoma	SP2/0 x balb/c
Immunogen	Purified human monocytes
Immunoglobulina	IgG1
Gatunek	Mysz
Źródło	Płyn z puchliny brzusznej lub supernatant z hodowli in vitro komórek hybrydomy
Oczyszczanie	Chromatografia powinowactwa
Fluorochrom	Pacific Blue
Stosunek molowy	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ wzbudzenia	405 nm
Maksimum emisji	455 nm
Bufor	PBS pH 7,2 plus 2 mg / mL BSA i 0,1% NaN_3

PRZEZNACZENIE
Niniejsze przeciwciało skoniugowane z fluorochromem umożliwia identyfikację populacji komórek, w których występuje ekspresja antygenu CD11b obecnego we krwi obwodowej człowieka, metodą cytometrii przepływowej.

ZASADA
Niniejszy test oparty jest na zdolności przeciwciał monoklonalnych do wiązania się z determinantami antygenowymi ulegającymi ekspresji na leukocytach.
Specyficzne barwienie leukocytów wykonuje się, inkubując próbkę z odczynnikiem IOTest. Krwinki czerwone zostają następnie usunięte drogą lizy, a leukocyty, na które proces ten nie wywiera wpływu, są analizowane metodą cytometrii przepływowej.
Cytometr przepływowy mierzy rozproszenie światła i fluorescencję komórek. Umożliwia oddzielenie badanej populacji w elektronicznym oknie zdefiniowanym na histogramie, które skorelowane jest z rozproszeniem światła padającego prostopadle (boczny detektor światła rozproszonego, SS) oraz rozproszeniem światła o wąskim kącie wiązki (przedni detektor światła rozproszonego, FS). Inne dostępne w cytometrze histogramy łączące dwa różne parametry można wykorzystywać jako pomocnicze na etapie bramkowania, w zależności od aplikacji wybranej przez użytkownika.

PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ KLINICZNYCH
CD11b może być przydatny w wykrywaniu i charakteryzowaniu zaburzeń hematologicznych (4-6). Cząsteczka CD11b ulega ekspresji w ostrej białaczce monoblastycznej i ostrej białaczce monocytarnej. Nieprawidłowa ekspresja CD11b ma znaczenie prognostyczne w zespołach mielodysplastycznych (MDS). Pacjenci, u których niewielki procent komórek szpikowych wykazuje ekspresję CD11b są bardziej narażeni na rozwój ostrej białaczki szpikowej w porównaniu do pacjentów, u których ekspresję CD11b obserwuje się w ponad 53% komórek szpiku (4). Ponadto CD11b można czasem zaobserwować w przypadku białaczki z dużych ziarnistych limfocytów T (7).

PRZECHOWYWANIE I TRWAŁOŚĆ
Skoniugowane formy płynne należy przechowywać w temperaturze 2 do 8°C i chronić przed dostępem światła przed i po otwarciu fiolki.
Trwałość zamkniętej fiolki: patrz data ważności na fiolce.
Trwałość fiolki po otwarciu: odczynnik zachowuje trwałość przez 180 dni.

ZAWARTOŚĆ ZESTAWU ODCZYNNIKÓW
Stężenie: patrz Świadectwo analizy dla partii na stronie internetowej www.beckmancoulter.com.

OZNAKI POGORSZENIA JAKOŚCI
Wszelkie zmiany wyglądu fizycznego odczynników mogą wskazywać pogorszenie jakości. Odczynnika takiego nie należy używać. W przypadku naruszenia opakowania lub jeśli uzyskane dane wskazują możliwość zmian dotyczących działania, należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub przesłać wiadomość na poniższy adres e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI
1. Nie używać odczynników po upływie daty ważności.
2. Nie zamrażać.
3. Przed użyciem pozostawić do uzyskania temperatury pokojowej (18 – 25°C).
4. Maksymalnie ograniczyć ekspozycję na światło.
5. Unikać mikrobiologicznego skażenia odczynników. Mogłoby ono doprowadzić do uzyskania fałszywych wyników.
6. Zachować ostrożność w trakcie pracy z roztworami przeciwciał zawierającymi azydek sodu (NaN_3). Nie stosować wewnętrznie. Unikać kontaktu ze skórą, błonami śluzowymi i oczami.
   Ponadto w środowisku kwaśnym, azydek sodu może tworzyć potencjalnie niebezpieczny kwas azotowodorowy. W razie konieczności utylizacji, zaleca się rozcieńczenie odczynnika w dużej ilości wody przed wylaniem do kanalizacji. Pozwoli to uniknąć nagromadzenia azydku sodu w metalowych rurach i zapobiegnie ryzyku wybuchu.
7. Wszystkie próbki krwi należy traktować jako potencjalnie zakaźne. Należy pracować z nimi, zachowując ostrożność (w szczególności: nosić rękawiczki ochronne, fartuchy i okulary).
8. Nigdy nie pipetować ustami i unikać kontaktu próbek ze skórą, błonami śluzowymi i oczami.
9. Probówki z krwią i materiały jednorazowe należy zutylizować do pojemników ad hoc przeznaczonych do spalania.
10. Odczynniki i odpady należy usuwać zgodnie z lokalnymi przepisami.

PRÓBKI
Krew żylną należy pobierać do sterylnych probówek z solą EDTA jako antykoagulantem.
Próbki należy przechowywać w temperaturze pokojowej (18 –25°C), nie wstrząsać. Przed pobraniem próbki testowej, próbki należy zhomogenizować za pomocą delikatnego wytrząsania.
Próbki należy poddać analizie w ciągu 24 godzin od pobrania krwi.

METODOLOGIA
NIEZBĘDNE MATERIAŁY (NIEDOSTARCZANE)
- Probówki i materiały niezbędne do pobrania próbek.
- Pipety automatyczne z jednorazowymi końcówkami 10, 100 i 500 µl.
- Plastikowe probówki hemolityczne.
- Kulki kalibracyjne:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Odczynnik powodujący lizę krwinek czerwonych z fazą wymywania po lizie. Na przykład: VersaLyse (nr kat. A09777).
- Odczynnik wiążący leukocyty. Na przykład: IOTest 3 Fixative Solution (nr kat. A07800).
- Mysz Kontrola izotypowa Pacific Blue: IOTest reagent (Ref. A74764).
- Bufor (PBS: 0,01 M fosforan sodu; 0,145 M chlorek sodu; pH 7,2).
- Wirówka.
- Wytrząsarka automatyczna (worteks).
- Cytometr przepływowy.

PROCEDURA
Dla każdej analizowanej próbki poza probówką testową zaleca się jedną probówkę kontrolną, w której komórki mieszane są w obecności kontroli izotypowej (nr kat. A74764).

1. Dodać 10 µl swoistego przeciwciała skoniugowanego IOTest do każdej probówki i 10 µl kontroli izotypowej do każdej probówki kontrolnej.
2. Dodać 100 µl próbki testowej do obu probówek. Delikatnie wymieszać probówki na worteksie.
3. Inkubować w temperaturze pokojowej (18 – 25°C) przez 15 do 20 minut, chroniąc probówki przed światłem.
4. Następnie wykonać lizę krwinek czerwonych, zgodne z zaleceniami dotyczącymi wybranego odczynnika litycznego.
   Na przykład, jeśli używany będzie odczynnik VersaLyse (nr kat. A09777), należy zapoznać się z ulotką i przestrzegać procedury o nazwie „z jednoczesnym utrwalaniem", która polega na dodaniu 1 ml mieszaniny „Fix-and-Lyse" przygotowanej bezpośrednio przed użyciem. Wymieszać natychmiast za pomocą worteksu przez 1 sekundę i inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem.

5. Wirować w temperaturze pokojowej przez 5 minut z prędkością 150 x g.
6. Usunąć supernatant przez aspirację.
7. Ponownie zawiesić osad komórek w 3 ml PBS.
8. Powtórzyć etap 5.
9. Usunąć supernatant poprzez aspirację i ponownie zawiesić osad komórek w:

- 0,5 ml PBS plus 0,1% formaldehydu, jeśli preparaty mają być przechowywane krócej niż 24 godzin(y). (0,1% roztwór formaldehydu w PBS można uzyskać rozcieńczając 12,5 µl IOTest 3 Fixative Solution (nr kat. A07800) w stężeniu 10X w 1 ml PBS).
- 0,5 ml bez PBS, jeśli preparaty zostaną poddane analizie w ciągu 2 godzin.

UWAGA: w każdej sytuacji preparaty należy przechowywać w temperaturze 2 do 8°C i chronić przed dostępem światła.

DZIAŁANIE

Dane dotyczące działania uzyskiwane są za pomocą procedury opisanej powyżej w ciągu 24 godzin od pobrania krwi, przy użyciu próbek pobranych do sterylnych probówek z solą EDTA jako antykoagulantem i przechowywanych w temperaturze 18-25°C. Analiza wykonywana jest w ciągu 24 godzin po barwieniu immunologicznym.

SWOISTOŚĆ

Antygen CD11b znany jest także pod kilkoma innymi nazwami, tj. łańcuch alfa M-integryny, Mac-1, CR3, iC3bR lub Mo1 (8, 9). Jest to integralna glikoproteina przezbłonowa typu I o masie 170 – 165 kDa, odpowiednio w środowisku redukującym/nieredukującym. CD11b posiada 19 miejsc potencjalnej N-glikozylacji (8).
Ekspresja łańcucha CD11b na powierzchni komórek wymaga obecności antygenu CD18 (nazywanego też łańcuchem beta2-integryny). Te dwie podjednostki tworzą razem integrynę CD11b/CD18, jeden z czterech heterodimerów integryny, które mogą powstawać przez asocjację łańcucha CD18β z czterema odrębnymi łańcuchami CD11α. Integryna CD11b/CD18 (αMβ2) nazywana jest także Mac-1. Integryna CD11b/CD18 posiada szeroki potencjał wiązania ligandu. Poza innymi ligandami może rozpoznawać CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, składową układu dopełniacza iC3b, fibrynogen oraz LPS/LBP [kompleks lipopolisacharydu (LPS) i białka wiążącego LPS] (8). Ponadto istnieją dowody na wewnątrzbłonowe interakcje CD11b/CD18 z cząsteczkami powierzchniowymi zakotwiczonymi za pośrednictwem GPI, np. CD16 lub CD14 (10). Interakcje te mogą wpływać na sygnałowanie przezbłonowe i funkcje efektorowe receptorów błonowych związanych z GPI. CD11b/CD18 ulega silnej ekspresji na limfocytach NK, neutrofilach, monocytach i makrofagach.
Przeciwciało monoklonalne BEAR1 (9) zostało zaliczone do CD11b w trakcie 6. warsztatów HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, które odbyły się w Kobe, Japonia, w 1996 r. (kod WS: A015, część Molekuły adhezyjne) (8).

PRECYZJA

Procent barwienia celu dodatniego określono za pomocą dwóch próbek pełnej krwi, analizowanych w dziesięciu powtórzeniach, tego samego dnia i za pomocą tego samego cytometru. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli:

Cel dodatni	Liczba	Średnia (%)		SD		CV (%)	
		Dawca 1	Dawca 2	Dawca 1	Dawca 2	Dawca 1	Dawca 2
Limfocyty CD11b $^+$	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocyty CD11b $^+$	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocyty CD11b $^+$	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

GRANICA WYKRYWALNOŚCI

Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Granica wykrywalności (LOD) to najniższe stężenie analitu, jakie może zostać wykryte. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli:

Cel dodatni	Granica wykrywalności
Limfocyty CD11b $^+$	2,0 Cells/ µL
Monocyty CD11b $^+$	2,0 Cells/ µL
Granulocyty CD11b $^+$	1,0 Cells/ µL

OGRANICZENIA TECHNIKI

1. Cytometria przepływowa może dawać wyniki fałszywe, jeśli cytometr nie został precyzyjnie wykalibrowany, nie skompensowano prawidłowo wycieków fluorescencji, oraz jeśli regiony nie zostały dokładnie ustawione.
2. Preferuje się technikę lizy RBC z etapem wymywania, ponieważ odczynnik ten nie został zoptymalizowany dla technik lizy bez wymywania.
3. Precyzyjne i powtarzalne wyniki można uzyskać, o ile stosowane procedury są zgodne z ulotką dotyczącą techniki i odpowiadają dobrej praktyce laboratoryjnej.
4. Skoniugowane przeciwciało w tym odczynniku jest wykalibrowane, aby zapewnić najlepszy współczynnik sygnału swoiste/nieswoiste. Dlatego też ważne jest, aby przy każdym teście stosować odpowiedni współczynnik objętości odczynnika/próbki.
5. W przypadku hiperleukocytozy krew należy rozcieńczyć w PBS, co pozwoli uzyskać stężenie leukocytów wynoszące ok. 5 x 10^9/l (2).
6. W przypadku pewnych chorób, np. ciężkiej niewydolności nerek lub hemoglobinopatii, liza krwinek czerwonych może przebiegać wolno, być niepełna lub nawet niemożliwa. W takiej sytuacji zaleca się przed barwieniem wyizolować komórki jednojądrzaste za pomocą gradientu gęstości (np. Ficoll) (3).

INNE INFORMACJE

Przykłady i odniesienia można znaleźć w Załączniku.

ZNAKI TOWAROWE

Beckman Coulter, stylizowane logoFlow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios oraz VersaLyse są znakami towarowymi firmy Beckman Coulter, Inc., zarejestrowanymi w USPTO.

Pacific Blue jest znakiem towarowym firmy Molecular Probes, Inc.

PRODUCENT:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Dział Obsługi Klienta: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Wszelkie prawa zastrzeżone.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296

50 testov; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Konjugovaná protilátka

IVD

CE

SLOVENSKY	Špecifikácia
Špecificita	CD11b
Klon	Bear1
Hybridom	SP2/0 x balb/c
Imunogén	Purified human monocytes
Imunoglobulín	IgG1
Živočíšny druh	Myš
Zdroj	Punktát z ascitu alebo supernatant in vitro kultivovaných hybridómových buniek
Purifikácia	Afinita Chromatografia
Fluorochróm	Pacific Blue
Molárny pomer	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ excitácia	405 nm
Maximum emisie	455 nm
Tlmivý roztok	PBS pH 7,2 plus 2 mg/mL BSA a 0,1% NaN_3

POUŽITIE
Táto protilátka konjugovaná na fluorochróm umožňuje identifikáciu bunkových populácií exprimujúcich antigén CD11b prítomných v ľudskej periférnej krvi. Metóda je založená na flow-cytometrii.

PRINCÍP
Test je založený na schopnosti monoklonálnych protilátok naviazať sa na antigénne determinanty exprimované leukocytmi.
Špecifické farbenie leukocytov prebieha inkubáciou vzorky s činidlom IOTest. Erytrocyty sa potom odstránia lýzou a leukocyty (neovplyvnené týmto procesom) sa analyzujú na flow-cytometri.
Flow-cytometer meria difúziu svetla a fluorescenciu buniek. Umožňuje stanovenie populácií záujmu v rámci elektronického okna definovaného na histograme, ktoré koreluje s ortogonálnou difúziou svetla (bočný rozptyl alebo SS) a difúziou svetla pod úzkym uhlom (dopredný rozptyl alebo FS). Ďalšie histogramy kombinujúce dva rôzne parametre, ktorými cytometer disponuje, je možné použiť ako podporné metódy v priebehu filtrovania v závislosti od aplikácie zvolenej používateľom.

PRÍKLADY KLINICKÝCH APLIKÁCIÍ
Molekula CD11b je užitočná pri detekcii a charakteristike hematologických ochorení (4-6). Molekula CD11b sa exprimuje pri akútnej monoblastovej leukémii a akútnej monocytárnej leukémii. Abnormality expresie CD11b majú prognostickú signifikanciu pri myelodysplastických syndrómoch (MDS). Pacienti s nízkym percentuálnym pomerom buniek kostnej drene exprimujúcich CD11b majú v porovnaní s pacientmi s menej než 53 % buniek kostnej drene exprimujúcich CD11b vyššie riziko rozvoja akútnej myeloidnej leukémie (4). Okrem toho sa CD11b niekedy objavuje pri veľkobunkovej leukémii granulárnych T-lymfocytov (7).

SKLADOVANIE A STABILITA
Konjugované tekuté formy je nutné skladovať pri teplote 2 až 8 °C a chrániť pred svetlom, a to pred otvorením ampulky i po ňom.
Stabilita uzavretej ampulky: pozri dátum exspirácie na ampulke.
Stabilita otvorenej ampulky: činidlo je stabilné 180 dní.

ČINIDLÁ V BALENÍ
Koncentrácia: Pozri certifikát analýzy špecifický pre šaržu na stránke www.beckmancoulter.com.

ZNÁMKY ZNÍŽENIA KVALITY
Akákoľvek zmena fyzického vzhľadu činidiel môže značiť zníženie kvality – činidlo v takom prípade nepoužívajte.
Ak je poškodené balenie alebo ak získané údaje poukazujú na zmenu funkčnosti, obráťte sa na miestneho distribútora alebo použite nasledujúcu e-mailovú adresu:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA
1. Činidlo nepoužívajte po uplynutí dátumu exspirácie.
2. Nemrazte.
3. Pred použitím činidlo ponechajte voľne, aby sa zahrialo na izbovú teplotu (18 – 25 °C).
4. Minimalizujte expozíciu svetlu.
5. Dávajte pozor, aby nedošlo k mikrobiálnej kontaminácii činidiel. Výsledky by mohli byť nesprávne.
6. S roztokmi protilátok obsahujúcimi azid sodný (NaN_3) je nutné pracovať opatrne. Neužívajte vnútorne. Látka nesmie prísť do kontaktu s kožou, sliznicami ani očami. V kyslom médiu môže azid sodný vytvárať potenciálne nebezpečný azoimid. Pri likvidácii sa odporúča činidlo nariediť vo veľkom množstve vody a naliať do odpadu. Nesmie dôjsť k nahromadeniu azidu sodného v kovových rúrkach. V takom prípade totiž hrozí explózia.
7. Všetky krvné vzorky je nutné považovať za potenciálne infekčné. Pracujte s nimi opatrne (hlavne: používajte ochranné rukavice, plášť a okuliare).
8. Nikdy nepipetujte ústami. Dávajte pozor, aby vzorky neprišli do kontaktu s vašou kožou, sliznicami a očami.
9. Skúmavky s krvou a jednorazový materiál použitý pri práci je nutné zlikvidovať do k tomu určených nádob, ktoré budú potom spálené.
10. Činidlá a odpad je nutné zlikvidovať v súlade s miestnymi predpismi.

VZORKY
Žilnú krv je nutné odobrať do sterilných skúmaviek so soľou EDTA ako antikoagulantom.
Vzorky udržujte pri izbovej teplote (18 – 25 °C), netrepte nimi. Vzorky je potrebné pred odberom testovej vzorky homogenizovať jemným premiešaním.
Vzorky je nutné analyzovať do 24 hodín od odberu krvi.

METODOLÓGIA
POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ NIE JE SÚČASŤOU BALENIA
- Odberové skúmavky a materiál potrebný k odberu.
- Automatické pipety s jednorazovými špičkami na 10, 100 a 500 µl.
- Plastové hemolyzačné skúmavky.
- Kalibračné guľôčky:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Lytické činidlo na erytrocyty s premytím po lýze. Napríklad: VersaLyse (Ref. A09777).
- Fixačné činidlo na leukocyty. Napríklad: Fixačný roztok IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Myš Izotypická kontrola Pacific Blue: Činidlo IOTest (Ref. A74764).
- Pufer (PBS: 0,01 M fosfátu sodného; 0,145 M chloridu sodného; pH 7,2).
- Centrifúga.
- Automatická miešačka (vírivka).
- Flow-cytometer.

POSTUP
Pri analýze každej vzorky sa okrem testovej skúmavky odporúča použiť jednu kontrolnú skúmavku, v ktorej bunky zmiešate v prítomnosti izotypickej kontroly (Ref. A74764).
1. Do každej testovej skúmavky pridajte 10 µl špecifickej konjugovanej protilátky IOTest a do každej kontrolnej skúmavky 10 µl izotypickej kontroly.
2. Do oboch skúmaviek pridajte 100 µl testovanej vzorky. Skúmavky jemne premiešajte vírením.
3. Inkubujte 15 až 20 minút pri izbovej teplote (18 – 25 °C) mimo priameho svetla.
4. Potom lyzujte erytrocyty – postupujte podľa odporúčaní k použitému lytickému činidlu. Napríklad: Ak chcete použiť prípravok VersaLyse (Ref. A09777), preštudujte si príbalovú informáciu a pracujte podľa postupu nazvaného „s konkomitantnou fixáciou“ – pozostáva z pridania 1 ml práve pripravenej zmesi „Fix-and-Lyse“ (Fixácia a lýza). Vzorku ihneď na to miešajte asi jednu sekundu vírením a inkubujte 10 minút pri izbovej teplote mimo priameho svetla.
5. Centrifugujte po dobu 5 minút pri 150× g pri izbovej teplote.
6. Naaspirujte všetok supernatant.
7. Bunkový terčík rozmiešajte v 3 ml PBS.
8. Zopakujte krok 5.
9. Naaspirujte supernatant a bunkový terčík rozmiešajte v nasledujúcom roztoku:

– 0,5 ml PBS plus 0,1 % formaldehydu, ak sa preparáty budú skladovať menej než 24 hodín. (0,1 % formaldehydový PBS získate nariedením 12,5 µl fixačného roztoku IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) pri jeho 10× koncentrácii v 1 ml PBS).
– 0,5 mL PBS bez formaldehydu, ak budú preparáty analyzované do 2 hodín.

POZNÁMKA: Vo všetkých prípadoch udržujte preparáty pri teplote v rozmedzí 2 až 8 °C a chráňte ich pred svetlom.

FUNKČNOSŤ

Údaje o funkčnosti testu vychádzajú z vyššie opísaného postupu pri vzorkách spracovaných do 24 hodín od odberu krvi do sterilných skúmaviek so soľou EDTA ako antikoagulačným činidlom, ktoré boli skladované pri teplote 18 – 25 °C. Analýza prebehla do 24 hodín od imunologického farbenia.

ŠPECIFICITA

Antigén CD11b je známy takisto pod niekoľkými ďalšími názvami, ako napríklad alfa-M integrínový reťazec, Mac-1, CR3, iC3bR alebo Mo1 (8, 9). Ide o integrálny transmembránový glykoproteín typu I s hmotnosťou 170 – 165 kDa za redukujúcich, resp. neredukujúcich podmienok. CD11b má 19 potenciálnych miest pre N-glykozyláciu (8).

Expresia reťazca CD11b na povrchu bunky vyžaduje prítomnosť antigénu CD18 (takisto známy ako beta-2-integrínový reťazec). Tieto dve podjednotky vytvárajú spolu integrín CD11b/CD18, jeden zo 4 integrínových heterodimérov, ktoré je možné vytvoriť spojením reťazca CD18 beta so 4 špecifickými reťazcami CD11 alfa. Integrín CD11b/CD18 (αMβ2) je takisto niekedy označovaný ako Mac-1. Integrín CD11b/CD18 je schopný viazať široké spektrum ligandov. Okrem iných ligandov je schopný rozpoznať molekuly CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, zložku komplementu iC3b, fibrinogén a LPS/LBP (komplex liposacharidu (LPS) a proteínu viažuceho LPS) (8). Takisto existujú dôkazy svedčiace pre intramembránové interakcie molekúl CD11b/CD18 s povrchovými molekulami ukotvenými pomocou DPI, ako napríklad CD16 alebo CD14 (10). Tieto interakcie môžu byť zodpovedné za transmbembránovú signalizáciu a efektorové funkcie membránových receptorov viazaných pomocou GPI. Expresia CD11b/CD18 je vysoká pri NK-lymfocytoch, neutrofiloch, monocytoch a makrofágoch.

Monoklonálna protilátka BEAR1 (9) bola k receptoru CD11b priradená na šiestom workshope HLDA k antigénom diferenciácie ľudských leukocytov v Kobe (Japonsko) v roku 1996 (kód WS: A015, Sekcia adhéznych molekúl) (8).

PRESNOSŤ

Percentuálny pomer zafarbených pozitívnych cieľov bol stanovený na dvoch vzorkách plnej krvi spracovaných v desiatich replikátoch v rovnaký deň a na tom istom cytometri. Získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke:

Pozitívny cieľ	Číslo	Priemer (%)		SD		CV (%)	
		Darca 1	Darca 2	Darca 1	Darca 2	Darca 1	Darca 2
Lymfocyty CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocyty CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocyty CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

LIMIT DETEKCIE

Štúdia prebehla v súlade s druhým vydaním schváleného odporučenia CLSI EP17-A2 , (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Limit detekcie (LOD) je najnižšia koncentrácia analytu, ktorú je systém schopný konzistentne detegovať. Získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke:

Pozitívny cieľ	Limit detekcie
Lymfocyty CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocyty CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocyty CD11b +	1,0 Cells/ µL

LIMITÁCIE TECHNIKY

1. Flow-cytometria môže viesť k nesprávnym výsledkom, ak bol cytometer nesprávne zarovnaný, ak neboli fluorescenčné úniky správne kompenzované a ak neboli správne určené polohy oblastí.
2. Odporúča sa používať techniku lýzy erytrocytov s premývaním, keďže toto činidlo nebolo optimalizované na techniky lýzy „bez premývania“.
3. Presné a reprodukovateľné výsledky získate, ak sa bude postupovať podľa zásad uvádzaných v technickej príbalovej informácii a zásad dobrej laboratórnej praxe.
4. Konjugovaná protilátka tohto činidla je nakalibrovaná, aby zaisťovala najlepší pomer špecifického/nešpecifického signálu. Z toho dôvodu je dôležité dodržať pomer objemu činidla/vzorky v každom teste.
5. V teréne leukocytózy narieďte krv v PBS, aby bola výsledná koncentrácia približne 5×10^9 leukocytov/l (2).
6. Pri určitých ochoreniach, ako sú napríklad závažné renálne zlyhanie alebo hemoglobinopatia, môže byť lýza erytrocytov pomalá, inkompletná, alebo dokonca nemožná. V takom prípade sa odporúča pred farbením odizolovať jednojadrové bunky na základe denzitného gradientu (napr. Ficoll) (3).

RÔZNE

Príklady a odkazy nájdete v prílohe.

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, štylizované logo, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios a VersaLyse sú ochranné známky spoločnosti Beckman Coulter, Inc. a sú registrované v USPTO.

Pacific Blue je ochranná známka spoločnosti Molecular Probes, Inc.

VÝROBCA:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Zákaznícka linka: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France
Made in France

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Všetky práva vyhradené.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296

50 теста; 0,5 mL
10 µL / тест

IOTest
Конюгирано антитяло

IVD

CE

България	Спесификации
Специфичност	CD11b
Клон	Bear1
Хибридома	SP2/0 x balb/c
Имуноген	Purified human monocytes
Имуноглобулин	IgG1
Вид	Мише
Източник	Асцитна течност или супернатант от in vitro култивирани хибридомни клетки
Пречистване	Афинитетна хроматография
Флуорохром	Pacific Blue
Моларно отношение	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
Възбуждане - λ	405 nm
Пик на излъчване	455 nm
Буфер	PBS pH 7,2 плюс 2 mg / mL BSA и 0,1% NaN3

УПОТРЕБА
Това флуорохром-конюгирано антитяло позволява идентифицирането на клетъчните популации, като проявява CD11b антигена, наличен в човешката периферна кръв, с помощта на поточна цитометрия.

ПРИНЦИП
Това изследване се базира на способността на конкретни моноклонални антитела да се свързват с антигенните детерминанти, проявени при левкоцитите. Специфичното оцветяване на левкоцитите се извършва чрез инкубиране на пробата с реактива на IOTest. След това червените клетки с премахват чрез лизиране, а левкоцитите, които не са засегнати от този процес, се анализират чрез поточна цитометрия.
Поточният цитометър измерва разсейването на светлината и флуоресценцията на клетките. Той позволява отделянето на границите на популацията, която е предмет на интерес, в рамките на електронния прозорец, определен на хистограма, който съответства на ортогоналното разсейване на светлината (Странично разпръскване или CP) и разсейването на тесноъгълната светлина (Предно разпръскване или ПР). Други хистограми, комбиниращи два от различните параметри, налични на цитометъра, могат да бъдат използвани като поддръжки при етапа на стробиранто, в зависимост от приложението, избрано от потребителя.

ПРИМЕРИ ЗА КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ
CD11b е полезен за откриване и характеризиране на хематологични заболявания (4-6). Молекулата на CD11b се изразява при остра миелобластна левкемия и остра моноцитна левкемия. Аномалиите на проявения CD11b имат прогностично значение при миелодиспластичните синдроми (MDS). Пациенти с нисък процент клетки от костен мозък с изразен CD11b са заплашени от по-висок риск от развитие към остра миелоидна левкемия в сравнение с пациенти с повече от 53% клетки от костен мозък с изразен CD11b (4). В допълнение, CD11b може понякога да бъде наблюдаван при Т-клетъчна левкемия от големи гранулирани лимфоцити (7).

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ
Конюгираните течни форми трябва да бъдат съхранявани при температура между 2 и 8°C и защитени от светлина преди и след отварянето на флакона.
Стабилност на затворения флакон: вижте срока на годност върху флакона.
Стабилност на отворения флакон: реактивът е стабилен за 180 дни.

СЪДЪРЖАНИЕ НА РЕАКТИВА
Концентрация: Вижте специфичния според партидата Сертификат за анализ на адрес www.beckmancoulter.com.

ДАННИ ЗА ВЛОШАВАНЕ
Всяка промяна във физическия вид на реактивите може да по казва влошаване и реактивът не трябва да се използва.
В случай на влошаване на опаковката или ако получените данни показват някаква промяна в работата, моля, свържете се с местния си дистрибутор или използвайте следния електронен адрес:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ
1. Не използвайте реактива след изтичане на срока на годност.
2. Не замразявайте.
3. Позволете стоплянето до стайна температура (18 – 25°C) преди употреба.
4. Минимизирайте излагането на светлина.
5. Избягвайте микробно замърсяване на реактивите, в противен случай можете да получите погрешни резултати.
6. Работете внимателно с разтворите с антитела, съдържащи натриев азид (NaN_3). Не приемайте вътрешно и избягвайте всякакъв контакт с кожата, лигавиците и очите.
   Освен това, в кисела среда, натриевият азид може да образува потенциално опасната азотоводородна киселина. Ако се наложи да го изхвърлите, се препоръчва реактивът да бъде разреден в голям обем вода, преди да бъде излят в канализацията, за да се избегне натрупването на натриев азид в металните тръби и да се предотврати рискът от експлозия.
7. Всички кръвни проби трябва да се считат за потенциално заразни и с тях трябва да се работи внимателно (в частност: да се носят защитни ръкавици, престилки и очила).
8. Никога не пипетирайте с уста и избягвайте всякакъв контакт на пробите с кожата, лигавиците и очите.
9. Кръвните епруветки и материалите за еднократна употреба, използвани при работата, трябва да бъдат изхвърлени в контейнери, предназначени за изгаряне.
10. Реактивите и отпадъците трябва да се унищожават в съответствие с местните изисквания.

ПРОБИ
Венозната кръв трябва да бъде вземана със стерилни епруветки, съдържащи динатриева сол EDTA като антикоагулант.
Пробите трябва да бъдат съхранявани при стайна температура (18 – 25°C) и да не бъдат разклащани.
Пробите трябва да бъдат хомогенизирани чрез леко разклащане преди вземането на пробата за изследване.
Пробите трябва да бъдат анализирани в рамките на 24 часа от венепункцията.

МЕТОДОЛОГИЯ
НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СЕ ДОСТАВЯТ
- Епруветки за проби и материали, необходими за вземането на пробите.
- Автоматични пипети с връхчета за еднократна употреба за 10, 100 и 500 µL.
- Пластмасови хемолизиращи епруветки.
- Калибриращи топчета:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Реагент за лизиране на червени кръвни клетки с етап на промиване след лизирането. Например: VersaLyse
  (Реф. A09777).
- Реактив за фиксиране на левкоцити. Например Фиксиращ разтвор за IOTest 3 (Реф. A07800).
- Mouse Изотипна контрола Pacific Blue: Реактив за IOTest (Реф. A74764).
- Буфер (PBS: 0,01 M натриев фосфат; 0,145 M натриев хлорид; pH 7,2).
- Центрофуга.
- Автоматична бъркалка (вихров тип).
- Поточен цитометър.

ПРОЦЕДУРА
За всяка анализирана проба, в допълнение към тестовата епруветка, се препоръчва една контролна епруветка, е която клетките са смесени в присъствието на изотипна контрола (Реф. A74764).

1. Добавете 10 от специфичното конюгирано антитяло за IOTest към всяка тестова епруветка и 10 µL от изотипната контрола към всяка контролна епруветка.
2. Добавете 100 µL от тестовата проба към двете епруветки. Завъртете епруветките леко.
3. Инкубирайте за 15 до 20 минути на стайна температура (18 – 25°C), защитено от светлина.
4. След това извършете лизиране на червените кръвни клетки, като следвате препоръките за използвания реактив за лизиране.
   Например, ако искате да използвате VersaLyse (Реф. A09777), вижте брошурата и за предпочитане следвайте процедурата, наречена «със съпътстващо фиксиране», която се състои в добавяне на 1 mL от предварителното подготвената смес «Fix-and-Lyse» (фиксиране-и-лизиране). Завъртете незабавно за една секунда и инкубирайте за 10 минути на стайна температура, защитено от светлина.
5. Центрофугирайте за 5 минути при 150 x g на стайна температура.
6. Премахнете супернатанта чрез аспириране.
7. Ресуспендирайте клетъчната пелета с помощта на 3 mL PBS.
8. Повторете стъпка 5.

9. Премахнете супернатанта чрез аспириране и ресуспендирайте клетъчната пелета с помощта на:

– 0,5 mL PBS плюс 0,1% формалдехид, ако препаратите ще бъдат съхранявани по-малко от 24 часа. (0,1% формалдехид PBS може да бъде получен чрез разтваряне на 12,5 µL от фиксиращия разтвор за IOTest 3 (Реф. A07800) при неговата 10X концентрация в 1 mL PBS).
– 0,5 mL PBS без формалдехид, ако препаратите ще бъдат анализирани в рамките на 2часа.

ЗАБЕЛЕЖКА: При всички случаи, съхранявайте препаратите при температура между 2 и 8°C и защитени от светлина.

РАБОТА

Данните за работата се получават с помощта на гореописаната процедура, извършена с проби в рамките на 24 часа от венепункцията, предварително взети в стерилни епруветки със сол EDTA като антикоагулант и съхранявани при 18-25°C. Анализът се извършва в рамките на 24 часа след имунооцветяването.

СПЕЦИФИЧНОСТ

Антигенът CD11b се нарича с още няколко други имена, например верига на алфа-M интегрин, Mac-1, CR3, iC3bR, или Mo1 (8, 9). Той е тип I интегрален трансмембранен гликопротеин с 170 – 165 kDa съответно при условия на редуциране / липса на редуциране. CD11b посочва 19 потенциални места за N-гликолизиране (8).

Проявяването на веригата на CD11b върху повърхността на клетката изисква наличието на антигена CD18 (известен още като верига на бета2 интегрин). Тези две поединици се комбинират, за да създадат CD11b/CD18 интегрин, един от 4-те интегринови хетеродимера, които могат да бъдат изградени при свързването на CD18 бета верига с 4 отличителни CD11 алфа вериги. CD11b/CD18 (αMβ2) интегринът се нарича също така Mac-1. CD11b/CD18 интегринът има големи възможности за свързване с лиганда. Наред с други лиганди, той може да разпознае CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, компонента на комплемента iC3b, фибриноген и LPS/LBP (комплекс от липополизахарид (LPS) и LPS-свързващ протеин) (8). Освен това съществуват данни за вътрешномембранни взаимодействия на CD11b/CD18 с молекули на повърхността, захванати за GPI, като например CD16 или CD14 (10). Тези взаимодействия могат да обяснят трансмембранната сигнализация и ефекторните функции на мембранните рецептори, свързани с GPI. CD11b/CD18 са силно проявени при NK лимфоцити, неутрофили, моноцити и макрофаги.

Моноклоналното антитяло BEAR1 (9) е било отнесено към CD11b по време на 6ия HLDA Семинар за човешките антигени на левкоцитната диференциация, проведен в Кобе, Япония през 1996 г. (WS код: A015, Раздел Адхезионни молекули) (8).

ПРЕЦИЗНОСТ

Процентът на оцветяване на положителна цел е бил определен с помощта на две проби с неразделена кръв, пуснати на десет репликата, в един и същ ден и с един и същ цитометър. Получените резултати са обобщени в следната таблица:

Положителна цел	Брой	Средна стойност(%)		SD		CV (%)	
		Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Лимфоцити CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Моноцити CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Гранулоцити CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

ГРАНИЦА НА ДЕТЕКЦИЯ

Проведено е проучване в съответствие с CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Границата на откриване (ГО) е най-ниската концентрация на анализираното вещество, която може да бъде засечена. Получените резултати са обобщени в следната таблица:

Положителна цел	Граница на детекция
Лимфоцити CD11b +	2,0 Cells/ µL
Моноцити CD11b +	2,0 Cells/ µL
Гранулоцити CD11b +	1,0 Cells/ µL

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ТЕХНИКАТА

1. Поточната цитометрия може да получи погрешни резултати, ако цимотетърът не е бил идеално подравнен, ако изтичанията на флуоресценция не са били правилно компенсирани и ако областите не са били разположени внимателно.
2. За предпочитане е да се използва техника за лизиране RBC с етап за промиване, тъй като този реактив не е бил оптимизиран за техники за лизиране «без промиване».
3. Точни и възпроизводими резултати се получават, стига използваните процедури са в съответствие с техническата листовка и са съвместими с добрите лабораторни практики.
4. Конюгираното антитяло на този реактив е калибрирано така, че да предлага най-доброто съотношение специфичен сигнал / неспецифичен сигнал. Следователно е важно да се придържате към съотношението обем на реактива / обем на пробата при всяко изследване.
5. В случая на хиперлевкоцитоза, разредете кръвта в PBS така, че да получите стойност от приблизително 5×10^9 левкоцити/L (2).
6. При някои болестни състояния като например тежка бъбречна недостатъчност или хемоглобинопатии, лизирането на червените кръвни клетки може да бъде бавно, непълно или дори невъзможно. В този случай се препоръчва да изолирате мононуклерните клетки с помощта на градиент на плътността (Ficoll например) преди оцветяването (3).

РАЗНИ

Вижте Приложението за примери и препратки.

TRADEMARKS

Beckman Coulter, стилизираното лого, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios и VersaLyse са запазени марки на Beckman Coulter, Inc. и са регистрирани в USPTO.

Pacific Blue е запазена марка на Molecular Probes, Inc.

ПРОИЗВЕДЕНО ОТ:

IMMUNOTECH SAS
Дружество на Beckman Coulter
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Марсилия, Седекс 9
France
Обслуване на клиенти: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Всички права запазени.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296

50 testiranja; 0,5 mL
10 µL / testu

IOTest
Konjugirano antitijelo

IVD CE

HRVATSKI	Specifikacije
Specifičnost	CD11b
Klon	Bear1
Hibridoma	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Purified human monocytes
Imunoglobulin	IgG1
vrsta	miš
Izvor	Ascitesna tekućina ili supernatant in vitro kultiviranih stanica hibridoma
Purifikacija	afinitetna kromatografija
Fluorokrom	Pacific Blue
Molarni omjer	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ ekscitacija	405 nm
Vrh emisije	455 nm
Pufer	PBS pH 7,2 плюс 2 mg / mL BSA и 0,1% NaN3

KORIŠTENJE
Ova sjedinjena protutijela fluorokroma omogućuju identifikaciju populacija stanica izražavajući CD11b prisutnost antigena u humanoj perifernoj krvi korištenjem protočne citometrije.

PRINCIP
Test se temelji na mogućnosti spcifičnih monoklonskih protutijela da se vežu na antigene determinante izražene u leukocitima.
Specifično bojanje leukocita je izvršeno inkubacijom uzoraka s IOTest reagensom. Crvene stanice potom su uklonjene lizom, a leukociti, na koje ne utječe ovaj postupak, su analizirani protočnom citometrijom.
Protočni citometar mjeri raspršivanje svijetlosti i fluorescenciju stanica. Čini mogućim razgraničenje populacije interesa unutar elektroničkog prozora definiranog na histogramu, a koji je u korelaciji s ortogonalnim raspršivanjem svijetla (Bočno raspršivanje ili SS) i raspršivanjem svjetla pod uskim kutom (Prednje raspršivanje ili FS). Ostali histogrami kombiniraju dva različita parametra koja su dostupna na citometru te se mogu koristiti kao podrška u fazi ulaženja ovisno o aplikaciji odabranoj od korisnika.

PRIMJERI KLINIČKE APLIKACIJE
CD11b je koristan za detekciju i karakterizaciju hematoloških poremećaja (4-6). CD11b molekula je izražena u aktunoj monoblastnoj leukemiji i akutnoj monocitinoj leukemiji. Abnormalnosti CD11b izražavanja imaju prognostičko značenje u mijelodisplastičnim sindromima (MDS). Pacijenti s niskim postotkom stanica koštane srži koje izražava CD11b imaju veći rizik razvoja akutne mijeloične leukemije u usporedbi prema pacijentima s više od 53% stanica koštane srži izraženih u CD11b (4). Nadalje, CD11b se ponekad može promatrati na T-staničnoj limfocitnoj leukemiji (7).

ČUVANJE I STABILNOST
Sjedinjene forme tekućine moraju se čuvati na temperaturi između 2 i 8°C te zaštićene od svijetla, prije i nakon što je bočica otvorena.
Stabilnost zatvorene bočice: pogledajte datum isteka roka valjanosti na bočici.
Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 180 dana.

SADRŽAJ REAGENSA
Koncentracija: Pogledate više specifičnih Certifikata analiza na www.beckmancoulter.com.

ZNAKOVI PROPADANJA
Svaka promjena fizičkog izgleda reagensa može označavati propadanje te se reagens ne smije koristiti.
U slučaju propadanja pakiranja ili ako dobiveni podaci pokazuju neke izmjene performansi, molimo Vas da se obratite lokalnom distributeru ili koristite sljedeću adresu e-pošte:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

MJERE PREDOSTROŽNOSTI
1. Ne koristite reagens kojem je istakao datum rok trajanja.
2. Ne zamrzavajte.
3. Prije korištenja pustite da dođe na sobnu temperaturu (18 – 25°C).
4. Minimalizirajte izloženost svijetlu.
5. Izbjegavajte mikrobiološku kontaminaciju reagenasa ili može doći do pogrešnih rezultata.
6. Otopine protutijela sadrže natrijev azid (NaN_3) i s njima treba rukovati s pažnjom. Ne gutajte i izbjegavajte sve kontakte s kožom, sluznicom i očima.
   Štoviše, u mediju kiseline, natrijev azid može oblikovati potencijalno opasnu hidrazin kiselinu. U slučaju da se treba odložiti, preporučuje se da se reagens razrijedi u velikim količinama vode prije isipanja u sustav za odvodnju kako bi se izbjeglo nakupljanje natrijevog azida u metalnim cijevima te spriječila opasnost od eksplozije.
7. Svi uzorci krvi moraju se smatrati kao potencionalno infektološki te se s njima mora pažljivo rukovati (posebice: nositi zaštitne rukavice, odore i naočale).
8. Ne prislanjajte pipetu ustima i izbjegavajte svaki dodir uzoraka s kožom, sluznicom i očima.
9. Epruvete za krv i materijal za jednokratnu uporabu koji je korišten za obradu treba odložiti u ad hoc spremnike namijenjene za spaljivanje.
10. Reagense i otpad treba eliminirati u skladu s lokalnim propisima.

UZORCI
Venska krv mora se prikupljati korištenjem sterilnih epruveta koje sadrže EDTA sol kao antikoagulat.
Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi (18 – 25°C) i ne smiju se tresti. Uzorke treba laganim mućkanjem homogenizirati prije vršenja testa uzorka.
Uzorci moraju biti analizirani unutar 24 sata od venipunkture.

METODOLOGIJA
POTREBAN MATERIJAL NIJE ISPORUCEN
- Epruvete za uzorke i materijal potreban za uzimanje uzoraka.
- Automatske pipete s jednokratnim nastavcima za 10, 100 i 500 µL.
- Plastične epruvete za hemolizu.
- Kalibracija zrnaca:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493).
- Reagens za lizu crvenih stanica s fazom ispiranja nakon lize. Na primjer : VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagens za fiksaciju leukocita. Na primjer : IOTest 3 otopine za fiksaciju (Ref. A07800).
- miš Izotipska kontrola: Pacific Blue: IOTest reagens. (Ref. A74764).
- Međuspremnik (PBS: 0,01 M natrijev fosfat; 0,145 M natrijev klorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska miješalica (tip Vortex).
- Protočni citometar.

POSTUPAK
Za svaki analizirani uzorak, u dodatku epruvete za test, preporučuje se jedna kontrolna epruveta u kojoj su stanice miješane u prisutnosti izotipske kontrole (Ref. A74764).

1. Dodajte 10 µL specifičnog IOTest sjedinjenog protutijela u svaku testnu epruvetu i 10 µL izotipske kontrole u svaku kontrolnu epruvetu.
2. Dodajte 100 µL testnog uzorka u obje epruvete. Lagano miješajte epruvete.
3. Inkubirajte 15 do 20 minuta na sobnoj temperaturi (od 18 – 25°C) zaštićeno od svijetlosti.
4. Potom izvedite lizu crvenih stanica, prema sljedećim preporukama za korištenje reagensa za lizu.
   Na primjer, ako želite koristiti VersaLyse (Ref. A09777), pogledajte letak i slijedite preferirani postupak zvan „s pratećom fiksacijom“, koji se sastoji od dodavanja 1 mL mješavine „Fiksiraj-i-liziraj“ pripremljene na licu mjesta. Odmah izmiješajte za jednu sekundu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svijetla.
5. Centrifugirajte 5 minuta na 150 x g na sobnoj temperaturi.
6. Aspiracijom uklonite plutajuću otopinu.
7. Ponovno isperite stanični pellet korištenjem 3 mL PBS-a.
8. Ponovite korak 5.
9. Aspiracijom uklonite lebdeće čestice i ponovno isperite stanični pellet korištenjem:

– 0,5 mL PBS-a plus 0,1% of formaldehida ako će se pripravci manje od 24 sati. (0,1%

formaldehida PBS-a se može dobiti razrjeđivanjem 12,5 µL IOTest 3 otopine za fiksaciju (Ref. A07800) u njezinoj 10X koncentraciji u 1 mL PBS-a).

- 0,5 mL PBS-a bez formaldehida, ako pripravak treba biti analiziran unutar 2 sata.

NAPOMENA: U svim slučajevima, čuvajte pripravke na temperaturi između 2 i 8°C te zaštićene od svijetla.

KARAKTERISTKE

Karakteristični podaci dobiveni su korištenjem gore opisanog postupka unutar 24 sata na uzorcima prethodno prikupljenih venipunkturno u sterilnim epruvetama s EDTA soli kao antikoagulantom te pohranjenih na temperaturi od 18 do 25°C. Analize su izvršene unutar 24 sata nakon imunocitokemijskog bojanja.

SPECIFIČNOSTI

CD11b antigen također se pojavljuje pod nekoliko drugih naziva npr. alfa-M integrin lanac, Mac-1, CR3, iC3bR ili Mo1 (8, 9). To je tip I integralnog transmembranskog glikoproteina od 170 – 165 kDa pod uvjetima odgovarajućeg smanjenja/nesmanjenja. CD11b prikazuje 19 potencijalnih mjesta N-glikozilacije (8).

Izražavanje CD11b lanca na površini stanica zahtjeva prisutnost CD18 antigena (poznatog i kao beta2 integrin lanac). Ove dvije podjedinice kombiniraju se za izradu CD11b/CD18 integrina, jedan od 4 heterodimer integrina koji se može ugraditi pridruživanjem CD18 beta lancu s 4 karakteristična CD11 alpfa lanca. CD11b/CD18 (αMβ2) integrin također je poznat kao Mac-1. CD11b/CD18 integrin ima široke mogućnosti vezivanja liganda. Može prepoznati CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, nadopunjujuću komponentu iC3b, fibrinogen i LPS/LBP (spoj lipopolisaharid (LPS) i LPS-vezujući protein) između ostalih liganda (8). Nadalje, postoje dokaz o međumembranskim interakcijama CD11b/CD18 s molekulama površina usidrenih GPI poput CD16 ili CD14 (10). Ove interakcije mogu se uzeti u obzir za transmembransko signaliziranje i efektorske funkcije receptora membrana povezanih GPI. CD11b/CD18 su vrlo izraženi u NK limfocitima, neutrofilusu, monocitima i makrofazima.

BEAR1 monoklonalno protutijelo (9) pridruženo je CD11b tijekom 6. HLDA radnog sastanka o Antigenima za diferencijaciju humanog leukocita u Kobeu, Japan, 1996. (WS kod: A015, Odjeljak o adheziji molekula) (8).

PRECIZNOST

Postotak bojanja pozitivnih ciljeva određen je korištenjem dva uzorka pune krvi, pokrenutog u deset ponavljanja, istog dana i korištenjem istog citometra. Dobiveni rezultati sažeti su u sljedećoj tablici:

Pozitivni cilj	Broj	Srednja vrijednost (%)		SD		CV (%)	
		Donator 1	Donator 2	Donator 1	Donator 2	Donator 1	Donator 2
Limfociti CD11b $^+$	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monociti CD11b $^+$	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulociti CD11b $^+$	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

OGRANIČENJE DETEKCIJE

Studij je sproveden u skladu s CLSI EP17-A2, , (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Ograničenje detekcije (eng.- Limit of Detection (LOD)) je najmanja koncentracija analita koji konzistentno može biti detektiran. Dobiveni rezultati sažeti su u sljedećoj tablici :

Pozitivni cilj	Ograničenje detekcije
Limfociti CD11b $^+$	2,0 Cells/ µL
Monociti CD11b $^+$	2,0 Cells/ µL
Granulociti CD11b $^+$	1,0 Cells/ µL

TEHNIČKA OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može proizvesti pogrešne rezultate ako citometar nije savršeno poravnat, ako fuorescentno curenje nije pravilno komnezirano i ako regije nisu pažljivo pozicionirane.
2. Poželjno je korištenje tehnike RBC lizije s korakom ispiranja budući da ovaj reagens nije optimiziran za tehnike „liziraj-ne ispiri“.
3. Točni i izvodljivi rezultati dobivat će se sve dok se postupci koriste u skladu s tehničkim listom i u skladu s dobrim laboratorijskim praksama.
4. Sjedinjeno protutijelo ovog reagensa kalibrirano je tako da nudi najbolji omjer specifičnog/nespecifičnog signala. Stoga, vrlo je važno čvrsto se držati omjera količine reagensa/količine uzorka u svakom testu.
5. U slučaju hiperlukocitoze, razrijedite krv u PBS-u kako biste dobili vrijednost od približno 5 x 10^9 leukocita/L (2).
6. U određenim stanjima bolesti, poput teških zatajenja bubrega ili hemoglobinopatije, liza crvenih stanica može biti spora, nepotpuna ili čak nemoguća. U tom slučaju, prije bojanja se preporučuje izolacija mononuklearnih stanica korištenjem gradijenta gustoće (na primjer Ficoll) (3).

RAZNO

Za primjere i reference pogledajte Dodatak.

ZAŠTITNI ZNAKOVI

Beckman Coulter, stilizirani logotip, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios i VersaLyse su zaštitni znakovi tvrtke Beckman Coulter, Inc., i registrirani su kod USPTO.

Pacific Blue je zaštitni znak tvrtke Molecular Probes, Inc.

PROIZVEDENO:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Služba za korisnike: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Sva prava pridržana.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 testų; 0,5 mL
10 µL / testą

IOTest
Konjuguotas antikūnas

IVD CE

LIETUVIŲ K.	Specifikacijos
Specifiškumas	CD11b
Klonas	Bear1
Hibridoma	SP2/0 x balb/c
Imunogenas	Purified human monocytes
Imunoglobulinas	IgG1
Rūšis	Pelė
Šaltinis	Ascitų skystis arba in vitro kultivuotų hibridomos ląstelių supernatantas
Gryninimas	Gimiringumo chromatografija
Fluorochromas	Pacific Blue
Molinis santykis	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ sužadinimas	405 nm
Emisijos smailė	455 nm
Buferinė medžiaga	PBS, pH 7,2 su 2 mg / mL BSA ir 0,1 % NaN_3

NAUDOJIIMAS
Naudojant šį su fluorochromu konjuguotą antikūną tėkmės citometrijos būdu galima identifikuoti ląstelių populiacijas, išreiškiančias CD11b antigeną, esantį žmogaus periferiniame kraujyje.

PRINCIPAS
Šis testas paremtas specifinių monokloninių antikūnų gebėjimu prisijungti prie leukocitų išreiškiamų antigeninių determinančių.
Specifinis leukocitų dažymas atliekamas mėginį inkubuojant su „IOTest“ reagentu. Raudonosios kraujo ląstelės tada pašalinamos lizuojant ir leukocitai, kurių nepaveikia šis procesas, analizuojami tėkmės citometrija.
Tėkmės citometras matuoja ląstelių šviesos difuziją ir fluorescenciją. Todėl dominančią populiaciją galima atskirti histogramoje apibrėžtame elektroniniame langelyje, kuris koreliuoja su statmena šviesos difuzija (šoninė sklaida arba SS) ir siauro kampo šviesos difuzija (tiesioginė sklaida arba FS). Kitas histogramas, kuriose derinami du skirtingi citometre galimi parametrai, galima naudoti kaip pagrindus per užtūros etapą atsižvelgiant į naudotojo pasirinktą programą.

KLINIKINIŲ PROGRAMŲ PAVYZDŽIAI
CD11b molekulė naudinga hematologiniams sutrikimams aptikti ir charakterizuoti (4–6). CD11b molekulė išreiškiama ūminės monoblastinės leukemijos ir ūminės monocitinės leukemijos atvejais. CD11b raiškos patologija turi prognozinės svarbos mielodisplazinių sindromų (MDS) atvejais. Pacientams, kurių nedidelis procentas kaulų čiulpų ląstelių išreiškia CD11b, kyla didesnė rizika ligai evoliucionuoti į ūminę mieloidinę leukemiją palyginti su pacientais, kurių daugiau nei 53 % kaulų čiulpų ląstelių išreiškia CD11b (4). Be to, CD11b galima kartais stebėti T ląstelių didelių granulinių limfocitų leukemijos atveju (7).

LAIKYMAS IR STABILUMAS
Prieš atidarant buteliuką ir jį atidarius konjuguotas skystąsias formas reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje ir saugoti nuo šviesos.
Uždaryto buteliuko stabilumas: žr. ant buteliuko nurodytą galiojimo pabaigos datą.
Atidaryto buteliuko stabilumas: reagentas stabilus 180 dien.

REAGENTO SUDĖTIS
Koncentracija: žr. specifinės partijos analizės sertifikatą adresu www.beckmancoulter.com.

GEDIMO POŽYMIAI
Bet koks reagentų fizinės išvaizdos pokytis gali rodytigedimą ir todėl reagento naudoti negalima.
Jei pastebite pakuotės gedimą arba jei gauti duomenys rodo apie tam tikrą veikimo duomenų pasikeitimą, kreipkitės į vietinį platintoją arba naudokite toliau pateiktą el. pašto adresą:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

ATSARGUMO PRIEMONĖS
1. Reagento nenaudokite pasibaigus jo galiojimo datai.
2. Neužšaldykite.
3. Prieš naudodami leiskite sušilti iki kambario temperatūros (18–25 °C).
4. Laikykite kuo mažiau apšviestoje vietoje.
5. Stenkitės reagentų neužteršti mikrobais, nes galima gauti klaidingus rezultatus.
6. Antikūnų tirpalus, kurių sudėtyje yra natrio azido (NaN_3), reikia naudoti atsargiai. Neprarykite ir venkite patekimo ant odos, gleivinių ir į akis.
   Be to, rūgščioje terpėje natrio azidas gali išskirti galimai pavojingą azido rūgštį. Jei reikia šalinti, reagentą rekomenduojama atskiesti dideliu vandens tūriu prieš išpilant į kanalizacijos sistemą, kad metaliniuose vamzdžiuose nesikauptų natrio azidas ir būtų išvengta sprogimo pavojaus.
7. Visus kraujo mėginius reikia laikyti kaip galinčius pernešti infekciją ir reikia naudoti atsargiai (tiksliau: mūvėti apsaugines pirštines, apsirengti chalatus ir užsidėti akinius).
8. Pipetės niekada nesiurbkite burna ir venkite bet kokio mėginių patekimo ant odos, gleivinių ir į akis.
9. Panaudotus kraujo mėgintuvėlius ir vienkartines medžiagas reikia išmesti į pritaikytas deginti ad hoc talpyklas.
10. Reagentus ir atliekas reikia šalinti laikantis vietinių reikalavimų.

MĖGINIAI
Veninio kraujo mėginius reikia imti naudojant sterilius mėgintuvėlius, kuriuose kaip antikoagulianto yra EDTA druskos.
Mėginius reikia laikyti kambario temperatūroje (18–25 °C) ir nepurtyti. Prieš imant tiriamąjį mėginį, mėginius reikia homogenizuoti atsargiai judinant.
Mėginius reikia ištirti per 24 val. po venos punkcijos.

METODIKA
NETIEKIAMOS BŪTINOS PRIEMONĖS
- Mėginiams imti būtini mėginių mėgintuvėliai ir priemonės.
- Automatinės pipetės su vienkartiniais 10 antgaliais, 100 ir 500 µL talpos.
- Plastikiniai hemolizės mėgintuvėliai.
- Kalibravimo granulės:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Raudonųjų kraujo ląstelių lizavimo reagentas su plovimo etapu po lizavimo. Pavyzdžiui: „VersaLyse“ (Nuor. A09777).
- Leukocitų fiksavimo reagentas. Pavyzdžiui: „IOTest 3“ fiksatyvo tirpalas (nuor. A07800).
- Pelė Izotipinė kontrolės medžiaga Pacific Blue: „IOTest“ reagentas (nuor. A74764).
- Buferinė medžiaga (PBS: 0,01 M natrio fosfato, 0,145 M natrio chlorido, pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatinė maišyklė (sūkurinio tipo).
- Tėkmės citometras.

PROCEDŪRA
Analizuojant kiekvieną mėginį be tiriamojo mėgintuvėlio rekomenduojama naudoti vieną kontrolės mėgintuvėlį, kuriame ląstelės sumaišytos su izotipine kontrolės medžiaga (nuor. A74764).

1. 10 µL specifinio „IOTest“ konjuguoto antikūno įpilkite į kiekvieną tiriamąjį mėgintuvėlį ir 10 µL izotipinės kontrolės medžiagos įpilkite į kiekvieną kontrolės mėgintuvėlį.
2. Į abu mėgintuvėlius įpilkite 100 µL tiriamojo mėginio. Mėgintuvėlius atsargiai išmaišykite.
3. 15–20 min. inkubuokite kambario temperatūroje (18–25 °C), saugodami nuo šviesos.
4. Tada atlikite raudonųjų kraujo ląstelių lizavimą vadovaudamiesi naudojamo lizavimo reagento rekomendacijomis.
   Pvz., jei norite naudoti „VersaLyse“ (nuor. A09777), žr. lankstinuką ir pageidautina vadovaukitės procedūra, vadinama „su vienalaikiu fiksavimu“, kuri apima 1 mL iškart paruošto „Fix-and-Lyse“ mišinio įpylimą. Iškart vieną sekundę maišykite ir 10 min. inkubuokite kambario temperatūroje, saugodami nuo šviesos.
5. 5 min. centrifuguokite veikiant 150 x g jėgai kambario temperatūroje.
6. Siurbdami pašalinkite supernatantą.
7. Ląstelių nuosėdas iš naujo suspenduokite 3 mL PBS tūryje.
8. Pakartokite 5 veiksmą.
9. Supernatantą pašalinkite išsiurbdami ir ląstelių nuosėdas iš naujo suspenduokite naudodami:
   - 0,5 mL PBS su 0,1 % formaldehido, jei preparatus reikės laikyti trumpiau nei 24 val. (0,1 % formaldehido PBS tirpalą galima gauti 10X koncentracijos 12,5 µL „IOTest 3“ fiksatyvo tirpalo (nuor. A07800) atskiedžiant 1 mL PBS tirpalo).
   - 0,5 mL PBS be formaldehido, jei preparatai bus analizuojami per 2 val.

PASTABA. Visais atvejais preparatus laikykite 2–8 °C temperatūroje ir saugodami nuo šviesos.

VEIKIMO DUOMENYS

Veikimo duomenys gauti naudojant anksčiau aprašytą procedūrą ir mėginius ištyrus per 24 val. po venos punkcijos, mėginius anksčiau surinkus į sterilius mėgintuvėlius, kuriuose kaip antikoaguliantas naudota EDTA druska, ir laikius 18–25 °C temperatūroje. Analizė atliekama per 24 val. po imuninio dažymo.

SPECIFIŠKUMAS

CD11b antigenas taip pat žinomas keliais kitais pavadinimais, t. y. alfa-M integrino grandine, Mac-1, CR3, iC3bR arba Mo1 (8, 9). Tai yra I tipo integralinis transmembraninis glikoproteinas, kurio masė 170–165 kDa atitinkamai redukuojančiomis / neredukuojančiomis sąlygomis. CD11b parodyta 19 galimų N-glikozilinimo vietų (8).
Kad ląstelių paviršiuje būtų išreiškiama CD11b grandinė, reikia CD18 antigeno (taip pat žinomo kaip beta2 integrino grandinė). Šie du subvienetai sukuria CD11b / CD18 integriną, vieną iš 4 integrino heterodimerų, kurie gali susiformuoti CD18 beta grandinę sujungus su 4 skirtingomis CD11 alfa grandinėmis. CD11b / CD18 (αMβ2) integrinas taip pat vadinamas Mac-1. CD11b / CD18 integrinas pasižymi plačiomis ligando prisijungimo galimybėmis. Be kitų ligandų jis gali atpažinti CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, komplemento komponentą iC3b, fibrinogeną ir LPS / LBP (lipopolisacharido (LPS) ir LPS prisijungiančio baltymo kompleksą) (8). Be to, yra intramembraninės CD11b / CD18 sąveikos su GPI prisijungusių paviršiaus molekulių, pvz., CD16 arba CD14, sąveikos įrodymų (10). Ši sąveika gali būti GPI susietų membraninių receptorių transmembraninio signalo perdavimo ir efektoriaus funkcijų priežastis. CD11b / CD18 molekulė gausiai išreiškiama ant NK limfocitų, neutrofilų, monocitų ir makrofagų.
BEAR1 monokloninis antikūnas (9) buvo priskirtas CD11b grupei per 6-ąjį Žmogaus leukocitų diferenciacijos antigenų HLDA seminarą Kobėje, Japonijoje, 1996 m. (WS kodas: A015, adhezijos molekulių skyrius) (8).

GLAUDUMAS

Teigiamų tikslinių mėginių dažymosi procentinė vertė buvo nustatyta naudojant du visos sudėties kraujo mėginius, juos ištyrus dešimčia kartotinių tyrimų per tą pačią dieną ir naudojant tą patį citometrą. Gauti rezultatai apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje:

Teigiamas tikslinis parametras	Skaičius	Vidurkis (%)		SN		CV (%)	
		1 donoras	2 donoras	1 donoras	2 donoras	1 donoras	2 donoras
Limfocitai CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocitai CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granuliocitai CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

APTIKIMO RIBA

Tyrimas buvo atliekamas laikantis CLSI EP17-A2, „ Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1). Aptikimo riba (angl. „Limit of Detection“, LOD) yra mažiausia analitės koncentracija, kurią galima nuosekliai aptikti. Gauti rezultatai apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje:

Teigiamas tikslinis parametras	Aptikimo riba
Limfocitai CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocitai CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granuliocitai CD11b +	1,0 Cells/ µL

METODIKOS APRIBOJIMAI

1. Tėkmės citometrija gali pateikti klaidingus rezultatus, jei citometras nebuvo puikiai sulygiuotas, jei fluorescencijos nuotėkiai nebuvo tinkamai kompensuoti ir jei sritys nebuvo kruopščiai nustatytos.
2. Pageidautina naudoti RBC lizavimo metodiką su plovimo veiksmu, nes šis reagentas nebuvo optimizuotas lizavimo be plovimo veiksmo metodikoms naudoti.
3. Tikslūs ir atkartojami rezultatai bus gaunami, kol procedūros naudojamos laikantis techninio informacinio lapelio ir atitinka gerą laboratorijos praktiką.
4. Šio reagento konjuguotas antikūnas sukalibruotas taip, kad būtų suteiktas geriausias specifinio / nespecifinio signalų santykis. Todėl atliekant kiekvieną testą svarbu laikytis reagento / mėginio tūrių santykio.
5. Hiperleukocitozės atveju kraują atskieskite PBS tirpalu taip, kad gautumėte maždaug 5 x 10^9 leukocitų/L vertę (2).
6. Esant tam tikroms ligų būklėms, pvz., sunkiam inkstų nepakankamumui arba hemoglobinopatijoms, raudonųjų kraujo ląstelių lizavimas gali būti lėtas, atliekamas ne iki galo arba net negalimas. Šiuo atveju prieš dažant monobranduoles ląsteles rekomenduojama atskirti naudojant tankio gradientą (pvz., „Ficoll“) (3).

ĮVAIRI INFORMACIJA

Pavyzdžių ir literatūros ieškokite priede.

PREKIŲ ŽENKLAI

„Beckman Coulter“, stilizuotas logotipas, „Flow-Check“, „Flow-Set“, „IOTest“, „Navios“, ir „VersaLyse“ yra „Beckman Coulter, Inc.“ prekių ženklai, užregistruoti JAV patentų biure (USPTO).

„Pacific Blue“ yra „Molecular Probes, Inc.“ prekės ženklas.

PAGAMINO:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Klientų aptarnavimas: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 „Beckman Coulter, Inc.“
Visos teisės saugomos.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 tests; 50 ml
50 µl / test

IOTest
Konjugetā antiviela

IVD CE

LATVIEŠU	Specifikācijas
Specifika	CD11b
Klons	Bear1
Hibridoma	SP2/0 x balb/c
Imunogens	Purified human monocytes
Imūnglobulīns	IgG1
Sugas	Pele
Avots	Ascīta šķidrums vai in vitro audzētu hibridomas šūnu centrifugāts
Attīrīšana	Radniecības noteikšanas hromatogrāfija
Fluorhroms	Pacific Blue
Molārā attiecība	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ ierosme	405 nm
Emisijas lielākā vērtība	455 nm
Buferšķīdums	PBS pH 7,2 plus 2 mg/mL BSA un 0,1% NaN_3

IZMANTOŠANA
Ar fluorhromu saistītās antivielas nodrošina šūnu populāciju, kas izdala CD11b antigēnu, noteikšanu cilvēka perifērajās asinīs, izmantojot plūsmas citometriju.

DARBĪBAS PRINCIPS
Šī testa pamatā ir specifisku monoklonālu antivielu spēja saistīties ar leikocītu izdalītām antigēnu determinantēm.
Noteikts leikocītu krāsojums tiek iegūts, paraugu inkubējot ar IOTest reaģentu. Sarkanās šūnas tiek atdalītas, izmantojot līzi, bet leikocīti, kurus šis process neietekmē, tiek analizēti plūsmas citometrijā.
Plūsmas citometrs mēra gaismas difūziju un šūnu fluorescenci. Tādēļ ir iespējama interesējošās populācijas ierobežošana elektroniskajā logā, kas definēts kā histogramma, kas korelē ar gaismas ortogonālo difūziju (sānu izkliedi jeb SS) un šaurleņķa gaismas difūziju (priekšējā izkliede jeb FS). Kā papildu metodes sinhronizācijas procesā iespējams izmantot citas citometrā pieejamās histogrammas, kurās iespējams kombinēt divus dažādus pieejamos parametrus atkarībā no lietotāja izvēlētā izmantojuma.

KLĪNISKO PIELIETOJUMU PIEMĒRI
CD11b ir noderīgs hematoloģisko traucējumu noteikšanai un raksturošanai (4-6). CD11b molekula tiek izdalīta akūtas monoblastiskas leikēmijas un akūtas monocītiskas leikēmijas gadījumos. CD11b izdales traucējumiem ir prognostiska nozīme mielodisplastisko sindromu (MDS) gadījumos. Pacientiem, kuriem mazs kaulu smadzeņu šūnu procentuālais skaits izdala CD11b, ir lielāks risks attīstīties akūtai mieloīdai leikēmijai, salīdzinot ar tiem pacientiem, kuriem vairāk par 53% kaulu smadzeņu šūnu izdala CD11b (4). Vēl CD11b reizēm var novērot T šūnu lielu granulāru limfocītu leikēmijas gadījumos (7).

UZGLABĀŠANA UN STABILITĀTE
Pirms un pēc flakona atvēršanas konjugetās šķirdumu formas ir jāuzglabā 2–8 °C temperatūrā un jāsargā no gaismas.
Aizvērta flakona stabilitāte: skatiet uz flakona norādīto derīguma termiņu.
Atvērta flakona stabilitāte: reaģents ir stabils 180 dienas.

REAĢENTA SASTĀVS
Koncentrācija: skatiet sērijas specifisko analīzes sertifikātu, kas atrodams vietnē www.beckmancoulter.com.

SADALĪŠANĀS PAZĪMES
Jebkuras reaģentu izskata pazīmes var norādīt, ka reaģents sadalās un to nedrīkst izmantot.
Ja iepakojums ir sadalījies vai iegūtajos datos ir novērojamas izmainītas veiktspējas pazīmes, lūdzu, sazinieties ar vietējo izplatītāju vai izmantojiet tālāk norādīto e-pasta adresi:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

PIESARDZĪBAS PASĀKUMI
1. Reaģentu nedrīkst izmantot, ja tā derīguma termiņš ir beidzies.
2. Nedrīkst sasaldēt.
3. Pirms lietošanas ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai (18–25 °C).
4. Minimizējiet pakļaušanu gaismas iedarbībai.
5. Izvairieties no reaģentu bakteriālas kontaminācijas, jo iespējami viltus rezultāti.
6. Izturieties rūpīgi, strādājot ar sķīdumiem, kuru sastāvā ir nātrija azīds (NaN_3). Nedrīkst lietot iekšķīgi, izvairieties no jebkādas saskares ar ādu, gļotādām un acīm.
   Skābes formā nātrija azīds var radīt potenciāli bīstamu hidrazoīdskābi. Ja to nepieciešams utilizēt, reaģentu ieteicams šķīdināt lielā daudzumā ūdens pirms izliešanas kanalizācijas sistēmā, lai novērstu nātrija azīda uzkrāšanos metāla caurulēs un novērstu sprādziena risku.
7. Visi asins paraugi ir jāuzskata par iespējami infekcioziem, un ar tiem ir jādarbojas uzmanīgi (tas ir: lietojot aizsargcimdus, priekšautus un brilles).
8. Pipeti nedrīkst izmantot ar muti, paraugi nedrīkst saskarties ar ādu, gļotādām un acīm.
9. Darbā izmantoto asins caurulīšu un vienreizlietojamo materiālu utilizācija ir jāveic ad hoc konteineros, kas paredzēti sadedzināšanai.
10. Reaģentu un atkritumu utilizācija ir jāveic atbilstoši vietējām prasībām.

PARAUGI
Venozās asinis jāņem, izmantojot sterilas mēģenes, kurās kā antikoagulants ir izmantots EDTA sāls.
Paraugi ir jāuzglabā istabas temperatūrā (18–25 °C), un tos nedrīkst kratīt. Pirms parauga ņemšanas ir jāveic paraugu homogenizācija, viegli saskalojot paraugus.
Paraugu analīze ir jāveic 24 stundu laikā pēc vēnas punkcijas.

METODOLOĢIJA
NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NETIEK PIEGĀDĀTI
- Paraugu ņemšanai nepieciešamās mēģenes un materiāli.
- Automātiskās pipetes ar vienreizlietojamiem uzgaļiem, kas paredzēti 10, 100 un 500 µl.
- Plastmasas hemolīzes mēģenes.
- Koagulācijas lodītes:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- sarkano šūnu līzes reaģents ar mazgāšanas posmu, kas tiek veikts pēc līzes. Piemēram: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leikocītu fiksācijas reaģents. Piemēram: IOTest 3 fiksēšanas šķīdums (Ref. A07800).
- Pele Izotipēšanas kontrole Pacific Blue: IOTest reaģents (Ref. A74764).
- Buferšķīdums (PBS: 0,01 M nātrija fosfāts; 0,145 M nātrija hlorīds; pH 7,2).
- Centrifūga.
- Automātisks maisītājs (Vortex tipa).
- Plūsmas citometrs.

PROCEDŪRA
Katram analizētajam paraugam papildus testa flakonam ieteicams izmantot vienu kontroles flakonu, kurā šūnas tiek sajauktas kopā ar izotipēšanas kontroli (Ref. A74764).

1. Katram testa flakonam pievienojiet 10 µL specifiskas IOTest konjugētas antivielas, un katram kontroles flakonam pievienojiet 10 µl izotipēšanas kontroles.
2. Abiem flakoniem pievienojiet 100 µl testa parauga. Viegli samaisiet mēģenes, izmantojot Vortex metodi.
3. Sargājiet no gaismas un istabas temperatūrā (18–25 °C) inkubējiet 15–20 minūtes.
4. Tad, ievērojot izmantotā līzes reaģenta lietošanas instrukcijas, veiciet sarkano šūnu līzi.
   Piemēram, ja vēlaties izmantot VersaLyse (Ref. A09777), skatiet pamācību, kā arī ieteicams ievērot procedūru "ar vienlaicīgu fiksāciju", kuras laikā vienlaikus tiek pievienots 1 ml sagatavotās mikstūras "Fix-and-Lyse". Izmantojot Vortex metodi, nekavējoties maisiet vienu sekundi, tad istabas temperatūrā, sargājot no gaismas, inkubējiet 10 minūtes.
5. Istabas temperatūrā centrifugējiet 5 minūtes, izmantojot 150 x g.
6. Aspirejot noņemiet virsējo slāni.
7. Atkārtoti atšķaidiet šūnu centrifugātu, izmantojot 3 ml PBS.
8. Atkārtojiet 5. darbību.
9. Aspirējot iegūstiet centrifugātu un atkārtoti atšķaidiet šūnu centrifugātu, izmantojot:
   – 0,5 ml PBS plus 0,1% formaldehīda, ja sagatavotais maisījums tiks uzglabāts mazāk nekā 24 stundas. (A 0,1% formaldehīda PBS var iegūt, atšķaidot 12,5 µl IOTest 3 fiksējošā šķīduma (Ref. A07800) 10X koncentrācijā ar 1 ml PBS).
   – 0,5 ml PBS bez formaldehīda, ja sagatavotais maisījums tiks analizēts 2 stundu laikā.

PIEZĪME: sagatavotos maisījums vienmēr uzglabājiet 2–8 °C temperatūrā un sargājiet no gaismas.

VEIKTSPĒJA

Veiktspējas dati ir iegūti, izmantojot iepriekš aprakstīto procedūru paraugiem 24 stundas pēc venozās punkcijas, kas iepriekš ir iegūti sterilās mēģenēs ar pievienotu antikoagulantu (EDTA sāli) un uzglabāti 18–25 °C temperatūrā. Analīze tika veikta 24 stundu laikā pēc imunoloģiskās krāsošanas.

SPECIFIKA

CD11b antigēnam ir vēl vairāki citi nosaukumi, piemēram, alfa-M integrīnu ķēde, Mac-1, CR3, iC3bR vai Mo1 (8, 9). Tas ir I veida integrāls transmembrānu glikoproteīns ar molekulāro svaru 170–165 kd attiecīgi reducējošā/nereducējošā stāvoklī. CD11b parāda 19 iespējamās N glikozilācijas vietas (8).

CD11b ķēdes izdalīšanai uz šūnu virsmas ir nepieciešama CD18 antigēna klātbūtne (vēl saukts par beta2 integrīnu ķēdi). Šīs divas apakšvienības tiek saistītas, lai izveidotu CD11b/CD18 integrīnu, kas ir viens no 4 integrīnu heterodimēriem, ko iespējams izveidot, saistot CD18 beta ķēdi ar 4 dažādām CD11 alfa ķēdēm. CD11b/CD18 (αMβ2) integrīns vēl tiek saukts par Mac-1. CD11b/CD18 integrīnam ir plašas ligandu saistīšanas spējas. Tas var atpazīt CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, komplementa sastāvdaļu iC3b, fibrinogēnu un LPS/LBP (lipopolisaharīda (LPS) un LPS saistošā proteīna kompleksu), kā arī citus ligandus (8). Vēl ir atklātas intramembrānu saistības starp CD11b/CD18 un GPI piestiprinātām virsmas molekulām, piemēram, CD16 vai CD14 (10). Šīs saistības var radīt transmembrānu signālu pārvadi un GPI saistīto membrānas receptoru efektora funkcijas. CD11b/CD18 lielā daudzumā izdala NK limfocīti, neitrofili, monocīti un makrofāgi.

Monoklonālā antiviela BEAR1 (9) tika nozīmēta CD11b 6. HLDA seminārā par cilvēku leikocītu diferenciācijas antigēniem (6th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens), kas notika Kobē, Japānā, 1996. gadā (WS kods: A015, Section Adhesion Molecules) (8).

PRECIZITĀTE

Pozitīvā mērķa krāsošanas precizitāte tika noteikta, izmantojot divus pilnasiņu paraugus, atkārtoti vienā dienā veicot pārbaudi desmit reizes, izmantojot vienu citometru. Iegūtie rezultāti ir apkopoti tabulā tālāk.

Pozitīvais mērķis	Skaitlis	Vidējais (%)		SD		CV (%)	
		1. donors	2. donors	1. donors	2. donors	1. donors	2. donors
Limfocīti CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monocīti CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulocīti CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

NOTEIKŠANAS ROBEŽVĒRTĪBA

Pētījums tika veikts saskaņā ar CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Noteikšanas robežvērtība (Limit of Detection — LOD) ir zemākā nosakāmā analizējamās vielas koncentrācija. Iegūtie rezultāti ir apkopoti tabulā tālāk.

Pozitīvais mērķis	Noteikšanas robežvērtība
Limfocīti CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monocīti CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulocīti CD11b +	1,0 Cells/ µL

METODES IEROBEŽOJUMI

1. Ja citometrs nav perfekti nolīdzināts, ja fluorescences noplūdes nav pareizi kompensētas vai ja reģioni nav pareizi novietoti, plūsmas citometrijas rezultāti var būt viltus.
2. Ieteicams izmantot RBC līzes metodi ar mazgāšanas darbību, jo šis reaģents nav optimizēts līzes metodēm "bez mazgāšanas".
3. Kamēr izmantotās procedūras ir saskaņā ar tehniskās informācijas ieliktni un ar labām laboratorijas prakses metodēm, tiks iegūti precīzi un atkārtojami rezultāti.
4. Šī reaģenta saistītā antiviela ir kalibrēta tā, lai nodrošinātu labāko specifiska signāla/nespecifiska signāla attiecību. Tādēļ reaģenta tilpuma/parauga tilpuma attiecību ir svarīgi noteikt katrā testā.
5. Hiperleikocitozes gadījumā asinis ir jāšķaida ar PBS, lai iegūtā vērtība būtu aptuveni 5 x 10^9 leikocīti/l (2).
6. Dažu saslimšanu gadījumos, piemēram, izteiktas nieru mazspējas vai hemoglobinopātijas gadījumā, sarkano šūnu līze var būt lēna, nepilnīga vai pat neiespējama. Šajā gadījumā pirms krāsošanas ieteicams izolēt mononukleārās šūnas, izmantojot blīvuma gradientu (piemēram, Ficoll) (3).

DAŽĀDI

Piemērus un atsauces skatiet pielikumā.

PREČU ZĪMES

Beckman Coulter, stilizētais logotips, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios un VersaLyse ir Beckman Coulter, Inc. preču zīmes, kas ir reģistrētas USPTO.

Pacific Blue ir Molecular Probes, Inc. preču zīme.

RAŽOTĀJS:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Klientu serviss: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Visas tiesības paturētas.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 analüüsi; 0,5 ml
10 µl / analüüs

IOTest
Konjugeeritud antikeha

IVD CE

EESTI KEEL	Spetsifikatsioonid
Eripära	CD11b
Kloon	Bear1
Hübridoom	SP2/0 x balb/c
Immunogeen	Purified human monocytes
Immunoglobuliin	IgG1
Liigid	Hiir
Päritolu	Katseklaasis kasvatatud hübridoomrakkude astsiidivedelik või ülemine vedelikukiht.
Puhastamine	Afiinsuskromotograafia
Fluorokroom	Pacific Blue
Molaarne suhe	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ stimulatsioon	405 nm
Kiirguse tipp	455 nm
Puhver	PBS pH 7,2 + 2 mg/ml BSA ja 0,1% NaN_3

KASUTAMINE
See fluorokroomiga konjugeeritud antikeha võimaldab voolutsütomeetriaga tuvastada rakupopulatsioone, mis väljendavad inimese perifeerses veres esinevat antigeeni CD11b.

PÕHIMÕTE
Katse põhineb konkreetsete monoklonaalsete antikehade võimel siduda end leukotsüütidel väljenduvate antigeensete determinantidega.
Leukotsüütide värvimine toimub proovi inkubeerimisel IOTesti reagenti. Punased verelibled eemaldatakse lüüsimisega ja voolutsütomeetriaga analüüsitakse leukotsüüte, mida lüüsimine ei mõjuta.
Voolutsütomeeter mõõdab valguse hajumist ja rakkude fluorestsentsi. Tänu sellele on võimalik piiritleda huvipakkuvat populatsiooni histogrammil määratud elektroonilise ava piires. Histogrammil on korreleeritud valguse ortogonaalne hajumine (külgmine hajumine ehk SS (Side Scatter)) ja kitsa nurgaga valguse hajumine (edaspidine hajumine ehk FS (Forward Scatter)). Teisi histogramme, mis ühendavad kaht tsütomeetrias saadaolevat parameetrit, saab kasutada stroobimise staadiumis olenevalt kasutaja valitud rakendusest.

NÄITEID KASUTUSEST MEDITSIINIS

CD11b on kasulik hematoloogiliste haiguste tuvastamisel ja kirjeldamisel (4–6). CD11b molekul on väljendatud ägedas monoblastses ja ägedas monotsütaarses leukeemias. Hälbed CD11b väljendamises on müelodüsplastiliste sündroomide (MDS) korral prognostilise tähtsusega. Patsientidel, kellel on CD11b-d väljendavaid luuüdirakke protsentuaalselt vähe, on suurem ägeda müeloidse leukeemia väljakujunemise oht võrreldes patsientidega, kellel on CD11b-d väljendavaid luuüdirakke rohkem kui 53% (4). Peale selle saab CD11b-d mõnikord uurida T-raku suure granulaarse lümfotsüüdi leukeemia korral (7).

SÄILITAMINE JA STABIILSUS
Enne ja pärast viaali avamist tuleb konjugeeritud vedeliku vorme hoida temperatuuril 2 kuni 8 °C ja eemal päikesevalgusest.
Suletud viaali stabiilsus: vaadake viaalil olevat aegumiskuupäeva.
Avatud viaali stabiilsus: reagent on stabiilne 180 päeva.

REAGENDI SISU
Kontsentratsioon: vaadake partiispetsiifilist analüüsisertifikaati aadressil www.beckmancoulter.com.

RIKNEMINE
Igasugune muutus reagendi füüsilises välimuses võib viidata riknemisele ja seda reagenti ei tohi kasutada.
Pakendi riknemisel või kui saadud andmed näitavad muutusi toimivuses, võtke ühendust kohaliku edasimüüjaga või kirjutage alloleval meiliaadressil:
immuno-techsup@beckmancoulter.com

ETTEVAATUSABINÕUD
1. Ärge kasutage reagenti pärast aegumiskuupäeva.
2. Ärge külmutage reagenti.
3. Enne kasutamist laske reagendil saavutada toatemperatuur (18–25 °C).
4. Minimeerige kokkupuudet valgusega.
5. Vältige reagentide mikroobset saastumist; see võib põhjustada valesid tulemusi.
6. Antikehade lahuseid, mis sisaldavad naatriumiasiidi (NaN_3), tuleb käsitseda ettevaatlikult. Ärge manustage reagente seespidiselt ja vältige kokkupuudet naha, limaskesta ning silmadega.
   Happelises keskkonnas võib naatriumasiid tekitada potentsiaalselt ohtlikku vesinikasiidhapet. Kui reagent tuleb kasutusest kõrvaldada, on soovitatav see enne kanalisatsiooni valamist lahjendada suure hulga veega, et vältida naatriumasiidi kogunemist metalltorudesse ja ära hoida plahvatusohtu.
7. Kõiki vereproove tuleb käsitleda potentsiaalselt nakkusohtlikena ning käsitseda ettevaatlikult (eeskätt kanda kaitsekindaid, -riideid ja -prille).
8. Ärge pipeteerige suuga ning vältige proovide kokkupuudet naha, limaskesta ja silmadega.
9. Käsitsemiseks kasutatavad verekatsutid ja ühekordselt kasutatav materjal tuleb visata tuhastamiseks mõeldud ad hoc-konteineritesse.
10. Reagendid ja jäätmed tuleb kasutusest kõrvaldada kohalikke nõudeid järgides.

PROOVID
Venoosne veri tuleb võtta steriilsetesse katsutitesse, mis sisaldavad antikoagulandina EDTA soola.
Proove tuleb hoida toatemperatuuril (18–25 °C) ja neid ei tohi raputada. Proove tuleb homogeniseerida neid enne katseproovi võtmist kergelt loksutades.
Proove tuleb analüüsida 24 tunni jooksul pärast veenipunktsiooni.

MEETOD
VAJALIKUD MATERJALID, MIDA EI OLE KAASAS
- Proovivõtmiseks vajalikud proovikatsutid ja materjalid.
- Automaatsed pipetid ühekordselt kasutatavate otsakutega 10 jaoks, 100 ja 500 µl.
- Hemolüüsi plastkatsutid.
- Kalibreerimisgraanulid:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Punaste vereliblede lüüsimise reagent loputusstaadiumi jaoks pärast lüüsimist. Näiteks VersaLyse (viide A09777).
- Leukotsüütide fikseerimisreagent. Näiteks IOTest 3 fikseerimislahus (viide A07800).
- Hiir Isotüüpne kontrollaine Pacific Blue: IOTest reagent (viide A74764).
- Puhver (PBS: 0,01 M naatriumfosfaati; 0,145 M naatriumkloriidi; pH 7,2).
- Tsentrifuug.
- Automaatne segur (keerise tüüpi).
- Voolutsütomeeter.

PROTSEDUUR
Iga analüüsitud proovi kohta on peale katsuti soovitatav kasutada ühte kontrollkatsutit, milles segatakse rakud isotüüpse kontrollainega (viide A74764).

1. Lisage igasse katsutisse 10 µl spetsiifilist IOTest konjugeeritud antikeha ja igasse kontrollkatsutisse 10 µl isotüüpset kontrollainet.
2. Lisage kumbagi katsutisse 100 µl katseproovi. Keerutage katsuteid õrnalt.
3. Inkubeerige 15 kuni 20 minutit toatemperatuuril (18–25 °C) ja eemal valgusest.
4. Seejärel lüüsige punaseid vereliblesid, järgides kasutatava lüüsimisreagendi soovitusi.
   Kui tahate kasutada näiteks VersaLyse'i (viide A09777), vaadake selle brošüüri ja järgige eeskätt protseduuri „kaasneva fikseerimisega", mis koosneb ettevalmistuseta prepareeritud 1 ml „Fix-and-Lyse" i segu lisamisest. Keerutage kohe üks sekund ja inkubeerige 10 minutit toatemperatuuril ja eemal valgusest.
5. Tsentriguugige 5 minutit toatemperatuuril kiirusel 150 × g.
6. Eemaldage aspiratsiooniga ülemine vedelikukiht.
7. Suspendeerige rakugraanuleid uuesti 3 ml puhvriga.
8. Korrake etappi 5.
9. Eemaldage aspiratsiooniga ülemine vedelikukiht ja suspendeerige rakugraanuleid uuesti.

- 0,5 ml puhvriga + 0,1% formaldehüüdiga, kui preparaati tuleb säilitada vähem kui 24 tundi. (0,1% formaldehüüdi puhvri saate, kui lahjendate 12,5 µl IOTest 3 fikseerimislahust (viide A07800) selle kümnekordse kontsentratsiooniga 1 ml puhvris).
- 0,5 ml puhvris ilma formaldehüüdita, kui preparaate tuleb analüüsida 2 tunni jooksul.

MÄRKUS. Preparaate tuleb alati hoida temperatuuril 2 kuni 8 °C ja eemal valguse eest.

TOIMIMINE

Andmed toimimise kohta saadakse ülalkirjeldatud protseduuriga 24 tunni jooksul proovide võtmisest antikoagulandina EDTA soolaga steriilsetesse katsutitesse, mida on säilitatud temperatuuril 18–25 °C. Analüüs tehakse 24 tunni jooksul pärast immunovärvimist.

ERIPÄRA

CD11b antigeenile viidatakse ka mitme teise nimega, nt alfa-M integriinahel, Mac-1, CR3, iC3bR või Mo1 (8, 9). See on I tüübi integraalne transmembraanne glükoproteiin 170–165 kDa vastavalt vähendavates/mittevähendavates tingimustes. CD11b näitab 19 potentsiaalset N-glükosüülimise asukohta (8).

CD11b ahela väljendamine raku pinnal eeldab CD18 antigeeni (ehk beeta2 integriinahela) olemasolu. Need kaks alamüksust ühendatakse, et luua CD11b/CD18 integriin, mis on üks 4 integriini heterodimeerist, mida saab luua, sidudes CD18 beetaahelat 4 eristatava CD11 alfaahelaga. CD11b/CD18 (αMβ2) integriini nimi on ka Mac-1. CD11b/CD18 integriinil on ulatuslikud ligandi sidumise võimalused. See suudab muude ligandite hulgast ära tunda CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, lisandkomponenti iC3b-d, fibrinogeeni ja LPS/LBP-d (lipopolüsahhariidi (LPS) ning LPS-siduva valgu kompleks) (8). Peale selle on tõendeid CD11b/CD18 ja GPI-ankurdatud pinnamolekulide (nt CD16 või CD14) membraanisisestest interaktsioonidest (10). Need interaktsioonid võivad seletada transmembraanset signaalimist ja GPI-ga ühendatud membraani retseptorite täiturfunktsioone. CD11b/CD18 on tugevalt väljendatud NK-lümfotsüütidel, neutrofiilidel, monotsüütidel ja makrofaagidel.

BEAR1 monoklonaalne antikeha (9) määrati CD11b-le kuuendal HLDA seminaril inimeste leukotsüütide eristamisantigeenide teemal, mis peeti 1996. aastal Jaapanis Kõbes (WS-kood: A015, adhesioonmolekulide jaotis) (8).

TÄPSUS

Positiivse sihtmärgi värvimise protsent määrati kahe täisvere prooviga, mida analüüsiti kümne koopiana samal päeval sama tsütomeetriga. Saadud tulemused on kokku võetud järgmises tabelis.

Positiivne sihtmärk	Arv	Keskmine (%)		Standard-hälve		Variatsioo-nikordaja (%)	
		1. doonor	2. doonor	1. doonor	2. doonor	1. doonor	2. doonor
Lümfotsüüdid CD11b +	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monotsüüdid CD11b +	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulotsüüdid CD11b +	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

TUVASTUSPIIR

Viidi läbi uuring kooskõlas standardiga CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Tuvastuspiir (Limit of Detection; LOD) on analüüdi madalaim kontsentratsioon, mida on võimalik järjekindlalt tuvastada. Saadud tulemused on kokku võetud järgmises tabelis.

Positiivne sihtmärk	Tuvastuspiir
Lümfotsüüdid CD11b +	2,0 Cells/ µL
Monotsüüdid CD11b +	2,0 Cells/ µL
Granulotsüüdid CD11b +	1,0 Cells/ µL

MEETODI PIIRANGUD

1. Voolutsütomeetria võib anda valesid tulemusi, kui tsütomeeter ei ole täiuslikult joondatud, pole kompenseeritud fluorestsentsi lekkeid ja piirkondade asukoht pole hoolikalt määratud.
2. Soovitatav on kasutada loputusega RBC-lüüsimist, kuna see reagent ei ole optimeeritud loputusega lüüsitehnikate jaoks.
3. Täpsed ja korratavad tulemused saadakse, kui kasutatavad protseduurid on kooskõlas tehnilise brošüüriga ning ühilduvad heade laboritavadega.
4. Reagendi konjugeeritud antikeha kalibreeritakse nii, et tagada parim spetsiifilise signaali ja mittespetsiifilise signaali suhe. Seetõttu on igas katses oluline kinni pidada reagendi mahu ja proovi mahu suhtest.
5. Hüperleukotsütoosi korral lahjendage verd puhvris, et saavutada väärtus umbes 5×10^9 leukotsüüti/l (2).
6. Haiguse teatud staadiumides, nt raske neerupuudulikkuse või hemoglobinopaatia korral võib punaste vereliblede lüüsimine olla aeglane, puudulik või isegi võimatu. Sellisel juhul on soovitatav isoleerida ühetuumsed rakud, kasutades enne värvimist tihedusgradienti (nt Ficoll) (3).

MITMESUGUST

Näiteid ja viiteid vaadake lisast.

KAUBAMÄRGID

Beckman Coulter, stiliseeritud logo, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios ja VersaLyse on ettevõtte Beckman Coulter, Inc. kaubamärgid ning registreeritud USPTO-s.

Pacific Blue on ettevõtte Molecular Probes, Inc. kaubamärk.

TOOTJA:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Klienditeenindus: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Kõik õigused on kaitstud.

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 testovi; 0,5 mL
10 µL / test

IOTest
Konjugovano antitelo

IVD CE

SRPSKI	Specifikacije
Specifičnost	CD11b
Klon	Bear1
Hibridom	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Purified human monocytes
Imunoglobulin	IgG1
Vrste	Miš
Izvor	Ascitna tečnost ili pluta u in vitro kulturi hibridoma ćelija
Pročišćavanje	Afinitetna hromatografija
Fluorohrom	Pacific Blue
Molarni opseg	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ nadraživanje	405 nm
Vrhunac emitovanja	455 nm
Pufer	PBS pH 7,2 plus 2 mg / mL BSA i 0,1% NaN_3

UPOTREBA
Ovo fluorohromno-konjugovano antitelo omogućava identifikaciju populacije ćelija izražavajući CD11b prisustvo antigena u ljudskoj perifernoj krvi pomoću citometrije.

NAČELO
Ovaj test je zasnovan na sposobnosti određenih antitela da se vežu za antigenske determinante izražene leukocitima.
Posebno bojenje leukocita obavlja se inkubacijom uzorka sa IOTest reagensom. Crvene ćelije se zatim uklanjaju lizom i leukociti, koji nisu pogođeni ovim postupkom, analiziraju se protokom citometrije.
Protočni citometar meri difuziju svetla i fluorescentnost ćelija. Omogućava razgraničavanje interesne populacije u okviru elektronskog prozora definisanog na histogramu, koji uspostavlja vezu između ortogonalne difuzije svetla (bočno rasejavanje ili SS) i difuzije svetla malog ugla (rasejavanje napred ili RN). Mogu se koristiti i drugi histogrami koji kombinuju dva različita parametra, dostupni pri citometriji, kao podrška fazi otvaranja/zatvaranja ćelije, u zavisnosti od primene koju je korisnik odabrao.

PRIMERI KLINIČKE PRIMENE
CD11b je koristan za otkrivanje i karakterizaciju hematoloških poremećaja (4-6). CD11b molekul je izražen kod akutne monoblastne leukemije i akutne monocitne leukemije. Abnormalnosti kod izražavanja CD11b imaju prognostički značaj kod mijelodisplastičnih sindroma (MDS). Kod pacijenata u čijoj koštanoj srži postoji mali procenat CD11b postoji veći rizik za razvoj akutne mijeloidne leukemije u poređenju sa pacijentima koji imaju više od 53% CD11b u koštanoj srži (4). Pored toga, CD11b može se ponekad posmatrati na T ćelijskoj granularnoj limfocitnoj leukemiji (7).

SKLADIŠTENJE I STABILNOST
Konjugovani tečni oblici se moraju čuvati na temperaturi između 2 i 8°C i zaštićeni od svetla, pre i nakon otvaranja bočice.
Stabilnost zatvorene bočice: pogledajte rok trajanja na bočici.
Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 180 dana.

SADRŽAJ REAGENSA
Koncentracija: Pogledajte Sertifikat analize specifičan za ovu seriju na www.beckmancoulter.com.

DOKAZ DOTRAJALOSTI/ POGORŠANJA STANJA
Svaka promena u fizičkom izgledu reagensa može da ukazuje na dotrajalost/pogoršanje stanja i taj reagens ne bi smeo da se koristi.
U slučaju dotrajalosti/pogoršanja stanja pakovanja ili ako dobijeni podaci ukazuju na promenu učinka, kontaktirajte svog lokalnog prodavca ili koristite sledeću adresu e-pošte: immuno-techsup@beckmancoulter.com

MERE OPREZA
1. Ne koristite reagens nakon roka trajanja.
2. Ne zamrzavajte.
3. Pustite da dostigne sobnu temperaturu (18 – 25°C) pre upotrebe.
4. Svedite izloženost svetlu na minimum.
5. Izbegavajte mikrobiološku kontaminaciju reagensa, jer to može dovesti do netačnih rezultata.
6. Treba pažljivo rukovati rastvorima antitela koji sadrže natrijum azid (NaN_3). Samo za spoljnu upotrebu i izbegavajte kontakt sa kožom, sluzokožom i očima.
   Štaviše, u kiseloj sredini, natrijum azid može da formira potencijalno opasnu azotvodoničnu kiselinu. Ako je potrebno da se odloži, preporučuje se da se reagens razblaži u velikim količinama vode pre sipanja u kanalizaciju kako bi se izbeglo nagomilavanje natrijumazida u metalnim cevima i sprečila opasnost od eksplozije.
7. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno infektivnim i njima se mora pažljivo rukovati (naročito: nošenje zaštitnih rukavica, ogrtača i naočara).
8. Nikada ne izvlačite ustima i izbegavajte svaki kontakt uzoraka sa kožom, sluzokožom i očima.
9. Epruvete za krv i i potrošni materijal za rukovanje treba odložiti u ad hok kontejnere koji se koriste za spaljivanje otpada.
10. Reagense i otpad treba ukloniti u skladu sa lokalnim propisima.

UZORCI
Krv iz vene se mora uzeti pomoću sterilnih epruveta koje sadrže EDTA so kao antikoagulans.
Uzorci treba da se čuvaju na sobnoj temperaturi (18 – 25°C) i ne smeju da se mućkaju. Uzorci treba da se homogenizuju blagim mućkanjem pre uzimanja probnog uzorka.
Uzorci moraju da se analiziraju najkasnije 24 sata nakon venepunkcije.

METODOLOGIJA
NIJE PRILOZEN NEOPHODAN MATERIJAL
- Epruvete za uzimanje uzoraka i materijal neophodan za uzimanje uzoraka.
- Automatske pipete sa vrhovima za jednokratnu upotrebu za 10, 100 i 500 µL.
- Plastične epruvete za hemolizu.
- Kuglice za kalibraciju:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- Reagens za lizu crvenih krvnih zrnaca sa fazom ispiranja nakon lize. Na primer: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagens za fiksiranje leukocita. Na primer: IOTest 3 rastvor fiksativa (Ref. A07800).
- Miš Izotipska kontrola Pacific Blue: IOTest reagens (Ref. A74764).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijum fosfat, 0,145 M natrijum hlorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska mešalica (vrtložna).
- Protočni citometar.

PROCEDURA
Za svaki analiziran uzorak, pored probne epruvete, preporučuje se korišćenje kontrolne epruvete u kojoj se ćelije mešaju u prisustvu izotipske kontrole (Ref. A74764).

1. Dodajte 10 µL specifičnih IOTest konjugovanih antitela svakoj probnoj epruveti, i 10 µL izotipske kontrole svakoj kontrolnoj epruveti.
2. Dodajte 100 µL probnog uzorka u obe epruvete. Blago izmešajte epruvete u vrtložnoj mešalici.
3. Inkubirajte 15 do 20 minuta na sobnoj temperaturi (18 - 25°C), zaštićeno od svetlosti.
4. Zatim izvršite lizu crvenih krvnih zrnaca, prateći preporuke korišćenog reagensa za lizu.

Na primer, ako želite da koristite „VersaLyse“ (Ref. A09777), pogledajte uputstvo i po mogućnosti sledite postupak pod nazivom „uz istovremeno fiksiranje“, koje se sastoji od dodavanja 1 mL „Fiksiranje-i-liza“ smeše pripremljene na licu mesta. Odmah izmešajte u vrtložnoj mešalici jednu sekundu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti.

5. Centrifugirajte 5 minuta na 150 x g, na sobnoj temperaturi.
6. Usisajte supernatant.
7. Ponovo suspendujte talog ćelija pomoću 3 mL PBS-a.
8. Ponovite korak br. 5.
9. Usisajte supernatant i ponovo suspendujte talog ćelija pomoću:

– 0,5 mL PBS-a plus 0,1% formaldehida ako preparati moraju da se čuvaju kraće od 24 sata. (PBS 0,1% formaldehida se može dobiti razređivanjem 12,5 µL IOTest 3 rastvora fiksativa (Ref. A07800) na njegovoj 10X koncentraciji u 1 mL PBS-a).
– 0,5 mL PBS-a bez formaldehida, ako će se preparati analizirati u roku od 2 sati.

NAPOMENA: U svim slučajevima, držite preparate na temperaturi od 2 do 8°C i zaštićene od svetlosti.

UČINAK

Podaci o učinku su dobijeni pomoću gore opisanog postupka na uzorcima u roku od 24 sata od venepunkcije prethodno prikupljenim u sterilnim epruvetama sa EDTA soli kao antikoagulansom i čuvane na temperaturi od 18-25°C. Analiza se vrši u roku od 24 časa od imunobojenja.

SPECIFIČNOST

CD11b antigen je takođe poznat pod nekoliko drugih imena, npr. alfa-M integrinski lanac, Mac-1, CR3, iC3bR ili Mo1 (8, 9). To je vrsta I integralnog transmembralnog glikoproteina od 170 – 165 kDa, u odnosu na to da li je pod smanjenim/nesmanjenim uslovima. CD11b prikazuje 19 potencijalnih N-glikozilacionih lokacija (8).

Prikazivanje CD11b lanca na površini ćelije zahteva prisustvo CD18 antigena (takođe poznatog kao beta2 integrinskog lanca). Ove dve pod-jedinice kombinuju se da bi se kreirao CD11b/CD18 integrin, jedan od 4 integrinska heterodimera koji se mogu izgraditi povezivanjem CD18 beta lanca sa 4 karakteristična CD11 alfa lanca. CD11b/CD18 (αMβ2) integrin takođe se naziva Mac-1. CD11b/CD18 integrin ima velika ligandna vezivna svojstva. On može da prepozna CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, komplementarnu komponentu iC3b, fibrinogen i LPS/LBP (kompleks lipopolisaharida (LPS) i LPS-vezivni protein), pored ostalih liganda (8). Pored toga, postoji dokaz o intramembranskim interakcijama CD11b/CD18 sa površinskim molekulima vezanim za GPI, kao što su CD16 ili CD14 (10). Ove interakcije mogu se posmatrati za transmembralnu signalizaciju i efektorsku funkciju membranskih receptora vezanih za GPI. CD11b/CD18 je veoma izražen u NK limfocitima, neutrofilima, monocitima i makrofagama.

BEAR1 monoklonalno antitelo (9) dodeljeno je za CD11b tokom 6. HLDA Radionice o diferencijaciji antigena ljudskih leukocita, održanoj u Kobeu, u Japanu, godine 1996. (WS kod: A015, Odeljak: Vezivni molekuli) (8).

PRECIZNOST

Procenat bojenja pozitivnog cilja određen je korišćenjem dva cela uzorka krvi, uzeta u deset ponavljanja, istog dana i pomoću istog citometra. Dobijeni rezultati su dati u sledećoj tabeli:

Pozitivni cilj	Broj	Srednja vrednost (%)		SD		CV (%)	
		Davalac 1	Davalac 2	Davalac 1	Davalac 2	Davalac 1	Davalac 2
Limfociti CD11b $^{+}$	10	27,94	28,46	0,84	0,57	2,99	2,01
Monociti CD11b $^{+}$	10	99,55	96,02	0,25	0,73	0,25	0,76
Granulociti CD11b $^{+}$	10	99,99	99,99	0,01	0,01	0,01	0,01

GRANICA OTKRIVANJA

Istraživanje je sprovedeno u skladu sa CLSI EP17-A2, (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (1)). Granica otkrivanja (LOD - eng. „Limit of Detection“) je najniža koncentracija analita koja se može stalno otkriti. Dobijeni rezultati su dati u sledećoj tabeli:

Pozitivni cilj	Granica otkrivanja
Limfociti CD11b $^{+}$	2,0 Cells/ µL
Monociti CD11b $^{+}$	2,0 Cells/ µL
Granulociti CD11b $^{+}$	1,0 Cells/ µL

OGRANIČENJA TEHNIKE

1. Protočna citometrija može da pruži netačne rezultate ako citometar nije savršeno usklađen, ako prodori fluorescencije nisu pravilno nadoknađeni i ukoliko regioni nisu pažljivo pozicionirani.
2. Poželjno je da koristite tehniku RBC lize sa korakom za ispiranje jer ovaj reagens nije optimizovan za tehniku lize „bez ispiranja“.
3. Tačni i reproduktivni rezultati će se dobiti sve dok su postupci koji se koriste u skladu sa tehničkim uputstvom za umetanje i usklađeni sa dobrim laboratorijskim praksama.
4. Konjugovana antitela ovog reagensa su kalibrisana tako da ponude najbolji odnos specifičnog/nespecifičnog signala. Zato je važno da se pri svakom testu pridržavate odnosa zapremine reagensa/zapremine uzorka.
5. U slučaju hiperleukocitoze, razredite krv u PBS-u tako da se dobije vrednost od oko 5 x 10^9 leukocita/L (2).
6. U pojedinim stadijuma bolesti, kao što je teška bubrežna insuficijencija ili hemoglobinopatija, liza crvenih krvnih zrnaca može biti spora, nepotpuna ili čak nemoguća. U tom slučaju, preporučuje se da se izoluju mononuklearne ćelije pomoću gradijenta gustine (na primer „Ficoll“) pre bojenja (3).

RAZNO

Pogledajte Dodatak za primere i reference.

ZAŠTITNI ZNAKOVI

Beckman Coulter, stilizovani logotip, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios i VersaLyse su zaštitni znakovi kompanije Beckman Coulter, Inc., i registrovani su kod USPTO.

Pacific Blue je zaštitni znak kompanije Molecular Probes, Inc.

PROIZVEDENO OD STRANE :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Korisnički servisi: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
Sva prava zadržana.

IOTest

CD11b-Pacific Blue

REF B36296

50 测试；0.5 mL

10 µL / 测试

IOTest
成对抗体

IVD

体外诊断用

CE

中文	规格
特异性	CD11b
克隆	Bear1
杂交瘤细胞	SP2/0 x balb/c
免疫原	Purified human monocytes
免疫球蛋白	IgG1
物种	小鼠
来源	在体外培养的杂交瘤细胞的腹水液或上层清液
纯化	亲和层析
荧光染料	Pacific Blue
摩尔比值	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ 励磁	405 nm
发射峰值	455 nm
缓冲液	PBS pH 7.2 与 2 mg / mL BSA 和 0.1% NaN_3

用途

此种成对的荧光染料抗体可进行细胞群鉴别，通过流式细胞分析仪 CD11b 表示人体外周血液中存在的抗原。

原理

本测试以特异性单克隆抗体粘附于白细胞产生的抗原免疫因子的能力为基础。

白细胞特异性染色是通过培养带有 IOTest 试剂的样品来进行的。然后，红血球通过溶解和白细胞被移除，其不受此过程的影响且由流式细胞分析仪分析。

流式细胞分析仪测量光散射和细胞荧光。它可以分隔直方图上定义的电子窗口内的有效细胞群，与垂直光散射（侧向角散射或 SS）和小角光散射（前向角散射或 FS）相关。组合了细胞分析仪上两个不同参数的其他直方图可用于门框阶段的支撑，具体取决于用户所选择的应用。

临床应用示例

CD11b 可用于血液病检测和鉴别 (4-6)。CD11b 分子在急性单核母细胞白血病和急性单核细胞白血病中表达。CD11b 的异常表达对骨髓增生异常综合症 (MDS) 有预兆作用。表达 CD11b 骨髓细胞百分比较低的患者患急性骨髓白血病的风险高于表达 CD11b 骨髓细胞百分比高于 53% 的患者 (4)。此外，有时可在 T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病上观察 CD11b (7)。

存放条件和稳定性

在打开试剂瓶前后，成对的液体必须存放在 2°C – 8°C 的条件下且要避光。

闭盖试剂瓶的稳定性：参见试剂瓶上的有效期。

开盖试剂瓶的稳定性：该试剂可稳定存放 180 天。

试剂成分

浓度：若要获取特定批次分析证书，请访问 www.beckmancoulter.com。

变质的迹象

试剂物理性质的变化会显示变质情况且试剂不可使用。

若包装变质或所得的数据显示某些性能发生改变，请联系您的当地经销商或发送邮件至以下电子邮箱：immuno-techsup@beckmancoulter.com

注意事项

1. 严禁使用失效的试剂。
2. 严禁冷冻。
3. 使用前，请将其恢复到室温 (18 – 25°C)。
4. 尽量少见光。
5. 避免试剂被微生物污染，否则会产生错误结果。
6. 含有叠氮化钠 (NaN_3) 的抗体溶液应谨慎处理。严禁口服，并避免其接触皮肤、粘膜和眼睛。

   此外，在中度酸性条件下，叠氮化钠可形成具有潜在危害的叠氮酸。

   若需要对其进行处置，建议您在将试剂倒入排污系统前用大量清水将其稀释，以避免叠氮化钠在金属管中累积并预防爆炸。
7. 所有血液样品必须视为潜在的传染源且必须谨慎处理（尤其要注意：佩戴防护手套、长外衣和护目镜）。
8. 切勿用嘴吸取，并避免样品接触皮肤、粘液和眼睛。
9. 用于操作的血液试管和一次性材料应在特别的容器中加以处置，以便于焚烧。
10. 应根据地方要求清除试剂和废液。

样品

必须使用将乙二胺四乙酸盐作为抗凝剂的无菌试管提取静脉血液。

样品必须存放在室温（18 – 25°C）条件下且不可晃动。提取测试样品前，应将样品轻轻搅动以使其均质化。

样品应在静脉穿刺后的 24 小时内进行分析。

方法

未提供必要材料

- 取样试管和取样所必须的材料。
- 带有一次性吸头的自动移液器可吸取 10、100 和 500 µL。
- 塑料溶血试管。
- 校准气泡：
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)。
- 红细胞溶解试剂在溶解后清洗。例如：Versa Lyse（参考 A09777）。
- 白细胞固定试剂。例如：IOTest 3 固定剂（参考 A07800）。
- 小鼠 同型质控品Pacific Blue：IOTest 试剂（参考A74764）。
- 缓冲液（PBS：0.01 M 磷酸钠；0.145 M 磷酸钠；pH 7.2）。
- 离心机。
- 自动搅拌器（涡旋型）。
- 流式细胞分析仪。

操作步骤

对于已分析的每种样品，除使用试管外，建议采用一个质控品管，以在其中混合细胞与同型质控品（参考 A74764）。

1. 添加 10 µL 特异性 IOTest 成对抗体到每个试管中，以及 10 µL 同型质控品到每个质控品管中。
2. 添加100 µL 测试样品到两种试管中。轻轻摇动试管。
3. 至少要在室温 (18 – 25°C) 下培育 15 至 20 分钟，且要避光。
4. 然后，遵循溶解试剂使用建议，将红细胞溶解。

   例如，若您要使用 VersaLyse（参考 A09777），请参考说明书，最好按照名为“与附随物固定”的规程操作，其包含临时添加 1 mL“固定和溶解”混合物。立即摇动 1 秒，并在室温条件下培育 10 分钟，且要避光。
5. 在室温下以 150 x g 的速度分离 5 分钟。
6. 通过吸样去除上层清液。
7. 在 3 mL PBS 中重新悬浮细胞微粒。
8. 重复第 5 步。
9. 通过吸样去除上层清液并在以下条件下重新悬浮细胞微粒：

- 0.5 mL PBS 和 0.1% 的甲醛若备品持续不到 24 小时。（可通过稀释 12.5 µL IOTest 3 固定剂（参考 A07800）（1 mL PBS 的浓度为 10X）获取 0.1% 的甲醛。）
- 0.5 mL PBS 无甲醛，若备品将在 2 小时内分析。

注释：在所有情况下，将备品存放在 2°C – 8°C 的条件下，且要避光。

性能

通过上述规程获取有关静脉刺穿 24 小时后样品的性能数据，该样品是先前在将乙二胺四乙酸盐作为抗凝剂的无菌试管中提取的并存放在 18°C – 25°C的条件下。在免疫染色后的 24 小时内进行分析。

特异性

CD11b 抗原也可通过其他名称表示，例如 alpha -M integrin 链、Mac-1, CR3、iC3bR 或 Mo1 (8, 9)。它是 I 类完整的跨细胞膜糖蛋白，在分子量减轻/未减轻的情况下分别为 170 kDa 和 165 kDa。CD11b 显示了 19 个潜在的 N 糖蛋白位置 (8)。

细胞表面 CD11b 链的表达需要 CD18 抗原的存在（也称为 beta2 整联蛋白链）。CD18 beta 链与 4 种不同的 CD11 alpha 链联合可以形成 4 种整联蛋白异二聚体，两个子单位结合生成的 CD11b/CD18 整联蛋白是其中之一。CD11b/CD18 (αMβ2) 整联蛋白也称作 Mac-1。CD11b/CD18 整联蛋白拥有广泛的配体结合功能。可识别其他配体中的 CD23、CD54 (ICAM-1)、CD102 (ICAM-2)、ICAM-4、补体成分 iC3b、纤维蛋白原以及 LPS/LBP（脂多糖复合体 (LPS) 和与 LPS 结合的蛋白）(8)。此外，有证据表明 CD11b/CD18 与CD16 或 CD14 等 GPI 锚定表面分子在内膜处相互作用 (10)。此相互作用可理解为与 GPI 相连的细胞膜受体发出了跨细胞膜信号并发挥了感应功能。CD11b/CD18 在 NK 淋巴细胞、嗜中性白细胞、单核细胞和巨噬细胞上有很强的表达。

在 1996 年于日本神户举行的第 6 届 人类白细胞分化抗原 (HLDA) 研讨会上，将 BEAR1 单克隆抗体 (9) 指定到 CD11b 中（WS 代码：A015, Section Adhesion Molecules）(8)。

精度

阳性目标的染色百分比通过使用两种全血样品、在同一天使用同样的分析仪进行 10次重复来加以确定。所得结果如下表所示：

阳性目标	数量	均值 (%)		SD		CV (%)	
		1 号供体	2 号供体	1 号供体	2 号供体	1 号供体	2 号供体
淋巴细胞 CD11b $^+$	10	27.94	28.46	0.84	0.57	2.99	2.01
单核细胞 CD11b $^+$	10	99.55	96.02	0.25	0.73	0.25	0.76
粒细胞 CD11b $^+$	10	99.99	99.99	0.01	0.01	0.01	0.01

检测限度

根据CLSIEP17-A2、《临床实验室测量程序的检测能力评估》、《第二版审定指南 (2)》开展研究工作。检测限度 (LOD) 是可持续检测的最低分析物浓度。所得结果如下表所示：

阳性目标	检测限度
淋巴细胞 CD11b $^+$	2.0 Cells/ µL
单核细胞 CD11b $^+$	2.0 Cells/ µL
粒细胞 CD11b $^+$	1.0 Cells/ µL

检测的局限性

1. 若流式细胞分析仪未完全校准、荧光泄漏未得到正确补偿或未在该区域谨慎定位，则分析仪会产生错误结果。
2. 最好采用带清洗步骤的RBC 溶解方法，因该试剂不能在“ 未清洗” 溶解方法中取得最佳效果。
3. 只要开展的程序符合技术说明和良好的实验室规范，便可得到精确且可复制的结果。
4. 该试剂的成对抗体已校准，以提供最佳的特异性信号/非特异性信号比。因此，在每次测试过程中遵守试剂量/样品量比至关重要。
5. 若白细胞过多，请在 PBS 中稀释血液，以获取约 5 x 10^9 白细胞/L (2)。
6. 在严重的肾衰竭、血红蛋白病等特定疾病状态中，红细胞溶解会变得缓慢、不完全，甚至无法实现。在此情况下，建议在染色 (3) 前通过密度梯度（例如聚蔗糖）隔离单核细胞。

其他参数

参见附录以获取示例和参考文献。

商标

Beckman Coulter、特征标志、Flow-Check、Flow-Set、IOTest、Navios 和 VersaLyse 是 Beckman Coulter, Inc.的商标，并在美国专利商标局 (USPTO) 注册。

Pacific Blue 是 Molecular Probes, Inc 公司的商标。

制造商：

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177– 13276 Marseille Cedex 9
France
客户服务：(33) 4 91 17 27 27

IMMUNOTECH SAS
贝克曼库尔特旗下公司
Lattre de Tassigny大道130号
B.P. 177 – 13276马赛Cedex 9
France (法国)

网址：www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
保留所有权利。

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 試験、0.5 mL
10 µL / 試験

IOTest
コンジュゲート抗体
IVD CE
体外診断用医薬品

日本語	仕様
特異性	CD11b
クローン	Bear1
ハイブリドーマ	SP2/0 x balb/c
免疫原	Purified human monocytes
免疫グロブリン	IgG1
免疫動物	マウス
ソース	腹水または in vitro で培養されたハイブリドーマ細胞の上清 生成 未定
精製法	アフィニティークロマトグラフィー
蛍光色素	Pacific Blue
モル比	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ 励起	405 nm
放出ピーク	455 nm
バッファ	PBS pH 7.2 および 2 mg / mL BSA および 0.1% NaN_3

用途
この蛍光標識抗体は、フローサイトメトリーを用いて、ヒト末梢血中に存在するCD11b抗原を発現する細胞集団の同定を可能にます。

原理
本試験は、白血球によって発現する抗原決定基に結合する特異的なモノクローナル抗体の能力に基づいています。
白血球の特異的染色は、IOTest 試薬で検体をインキュベートすることによって行われます。溶解によって赤血球が除去され、溶解の影響を受けない白血球をフローサイトメトリーで分析します。
フローサイトメーターは、細胞の光拡散および蛍光発光を測定します。光の直交拡散 (側方散乱または SS) および狭角光の拡散 (前方散乱または FS) の相互関係を示す、ヒストグラム上に定義されたウィンドウ内の関心のある集団の範囲を定めることができます。サイトメーターで使用可能な 2 つのパラメータを組み合わせたヒストグラムを、ユーザーが選択したアプリケーションに応じたゲーティング段階の支援として使用することができます。

臨床での応用例
CD11b は、血液疾患の検知および特性評価に役立ちます (4 ~ 6)。CD11b 分子は、急性単芽球性白血病と急性単球性白血病で発現します。CD11b 発現の異常は、骨髄異形成症候群 (MDS) の予後において重要です。CD11b を発現する骨髄細胞の割合が低い患者は、CD11b を発現する骨髄細胞が 53% を超える患者と比較して、急性骨髄性白血病に進行するリスクが高くなります (4)。また、T細胞大顆粒リンパ球性白血病で CD11b の発現が認められる場合があります (7)。

取扱上の注意事項
コンジュゲート液は、バイアル瓶を開封する前および開封した後に関わらず、2 ~ 8°C の遮光した場所に保管してください。
未開封瓶の使用期限: 瓶上に記載。
開封瓶の使用期限: 開封後の試薬は180 日以内に使用してください。

試薬組成
濃度: ロット別分析証明書 (www.beckmancoulter.com) をご覧ください。

変質や劣化の兆候
試薬の見た目に何らかの変化があった場合、試薬が劣化している可能性があります。その場合は試薬を使用しないでください。
梱包が破損している場合、得られたデータが何らかの性能の変化を示す場合、お近くの販売業者または以下のメールアドレスにお問い合わせください。
immuno-techsup@beckmancoulter.com

注意
1. 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
2. 凍結しないでください。
3. 使用前は室温 (18 ~25°C) に戻してください。
4. できるだけ光に当てないようにしてください。
5. 試薬が微生物に汚染されないように注意してください。汚染されると誤った結果が出る恐れがあります。
6. アジ化ナトリウム (NaN_3) を含む抗体溶液は、取り扱いに注意してください。飲んだり、肌、粘膜および目に直接触れないようにしてください。
   また、アジ化ナトリウムを酸性媒体に入れた場合、危険な水素酸を形成する場合があります。アジ化ナトリウムを含む試薬を廃棄する必要がある場合、金属製のパイプにアジ化ナトリウムが蓄積しないよう、また爆発の危険性を防ぐよう、試薬を多量の水で希釈してから排水システムに廃棄することをお勧めします。
7. 血液サンプルはすべて感染の可能性があるため、注意して取り扱ってください (保護用手袋、ガウン、ゴーグルを着用してください)。
8. サンプルを口に含んだり、肌、粘膜および目に直接触れないようにしてください。
9. 血液チューブおよび処理に使用する使い捨て器具は、焼却用の特別な容器に廃棄する必要があります。
10. 試薬および廃棄物は、地域で決められた廃棄方法に従って廃棄してください。

サンプル
静脈血は、抗凝固剤として EDTA 塩を含む滅菌チューブを使用して採取する必要があります。
サンプルは常温 18 ~ 25°C) で保管し、揺らさないようにしてください。試験サンプルを採取する前に、血液サンプルを軽くかくはんして均質化する必要があります。
サンプルは、静脈穿刺から 24 時間以内に分析する必要があります。

方法
用意する器具
- サンプル採取チューブおよびサンプル採取に必要な器具。
- 使い捨てチップ付き自動ピペット (10、100 および 500 µL 用)。
- プラスチック製溶血反応チューブ。
- キャリブレーションビーズ:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- 洗浄段階が溶解後の赤血球溶解試薬。例 : VersaLyse (製品番号 A09777)。
- 白血球固定試薬。例 : IOTest 3 固定試薬 (製品番号 A07800)。
- マウス アイソタイプコントロールPacific Blue: IOTest 試薬 (製品番号A74764)。
- バッファ(PBS: 0.01 M リン酸ナトリウム、0 .145 M 塩化ナトリウム、pH 7.2)。
- 遠心分離機。
- 自動かくはん機 (Vortex タイプ)。
- フローサイトメーター。

操作手順
分析する各サンプルについて、試験チューブのほか、アイソタイプコントロール下で細胞を混合する対照チューブを 1 つ用意することをお勧めします (製品番号 A74764)。

1. IOTest 共役特異抗体 10 µL を各試験チューブに、アイソタイプコントロール 10 µL を対照チューブに追加します。
2. 試験サンプル100 µL を両方のチューブに追加します。チューブを軽くかくはんします。
3. 遮光した室温 (18 ~ 25°C) で最低 15 ~ 20 分インキュベートします。

4. 使用する溶解試薬の推奨事項に従い、赤血球を溶解します。
   たとえば、VersaLyse (製品番号 A09777) を使用する場合、パンフレットを参照し、その場で調製した「Fix-and-Lyse」混和液を 1 mL 添加して「同時に固定」するという手順に従うことが推奨されます。その後すぐに 1 秒間かくはんし、遮光した室温で 10 分間インキュベートします。
5. 150 x g で 5 分間室温で遠心分離します。
6. 吸引して浮遊物を取り除きます。
7. 3 mL の PBS で細胞ペレットを再懸濁します。
8. ステップ 5 を繰り返します。
9. 吸引により上清を除去し、以下を使用して細胞ペレットを再懸濁します。

– 調製液の保存時間が24 時間を下回る場合、0.1% のホルムアルデヒドを含む PBS 0.5 mL (0.1% のホルムアルデヒド入り PBS は、濃度 10 倍のIOTest 3 固定液 (製品番号 A07800) 12.5 µL を PBS 1 mL で希釈して調製することができます)。
– 調製液を2 時間以内に分析する場合、ホルムアルデヒドを含まない PBS 0.5 mL。

注記: いかなる場合でも、遮光した 2 ~ 8°C の場所で保管してください。

性能

性能データは、抗凝固剤として EDTA 塩を使用した滅菌チューブで採取し、18 ~ 25°C で保管したサンプルに対し、静脈穿刺から 24 時間以内に上記の手順を行うことで得られます。分析は、免疫染色後 24 時間以内に行います。

特異性

CD11b 抗原は、α -M インテグリン鎖、Mac-1、CR3、iC3bR、または Mo1 としても知られ(8,9)、 還元状態、非還元状態でそれぞれ 170 – 165 kDa の I型膜内在性糖タンパクです。CD11b は、19 の潜在的な N 糖鎖付加部位 (8) を示します。
細胞表面での CD11b 鎖の発現には、CD18 抗原 (β 2 インテグリン鎖としても知られています) の存在が必要です。これら 2 つのサブユニットは、CD18β 鎖と 4 つの顕著なCD11α 鎖の結合により組成することができる 4 つのインテグリンヘテロ二量体である CD11b/CD18 インテグリンを作成します。CD11b/CD18 (α M β 2) インテグリンは、Mac-1 とも呼ばれています。CD11b/CD18 インテグリンには、幅広いリガンド結合能があり、 様々なリガンドのうち、CD23、CD54 (ICAM-1)、CD102 (ICAM-2)、ICAM-4、補体成分 iC3b、フィブリノゲン、および LPS/LBP (リポ多糖体 (LPS) と LPS 結合タンパク質との複合体) を認識することができます (8)。また、CD16 や CD14 など、GPI アンカー型表面分子とのCD11b/CD18 の膜内相互作用を示すエビデンスがあります (10)。これらの相互作用は、GPI 修飾膜受容体の膜透過シグナルおよびエフェクター機能の要因となることが考えられます。CD11b/CD18 は、NK リンパ球、好中球、単球とマクロファージで高度に発現しています。
1996 年、神戸で開催された「ヒト白血球分化抗原に関する第 6 回 HLDA ワークショップ」において、BEAR1 モノクローナル抗体 (9) が CD11b に割り当てられました (WS Code: A015, Section Adhesion Molecules) (8)。

精密度

陽性ターゲットの染色の割合は、2 つの全血サンプルを使用し、同じ日に同じサイトメーターを使用し、10 回測定を行って決定しました。取得した結果は、下表に表示されています。

陽性ターゲット	数	平均値 (%)		SD		変動係数 (%)	
		ドナー 1	ドナー 2	ドナー 1	ドナー 2	ドナー 1	ドナー 2
リンパ球 CD11b +	10	27.94	28.46	0.84	0.57	2.99	2.01
単球 CD11b +	10	99.55	96.02	0.25	0.73	0.25	0.76
顆粒球 CD11b +	10	99.99	99.99	0.01	0.01	0.01	0.01

検出限界

試験は、CLSI EP17-A2 (1) (Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (2))」に従って実施されました。検出限界 (LOD) は、一貫して検出できる最も低い検体の濃度です。取得した結果は、下表に表示されています。

陽性ターゲット	検出限界
リンパ球 CD11b +	2.0 Cells/ µL
単球 CD11b +	2.0 Cells/ µL
顆粒球 CD11b +	1.0 Cells/ µL

手法の限界

1. フローサイトメトリーは、サイトメーターが完全に配列されていない場合、蛍光リークが正しく相殺されていない場合、領域が慎重に配置されていない場合、誤った結果が出る可能性があります。
2. この試薬は「洗浄のない」溶解法には適していないため、洗浄手順を含む赤血球溶解法の使用が推奨されます。
3. 添付文書および医薬品安全性試験実施基準に従って手順を行う限り、正確かつ再現可能な結果が得られます。
4. 本試薬の共役抗体は、最も優れた特異的シグナル/非特異的シグナル比が得られるよう、キャリブレーションされます。そのため、すべての試験で試薬量/サンプル量の比を守ることが重要です。
5. 白血球増加症の場合、白血球数がおよそ 5 x 10^9 個/L (2) となるよう、血液を PBS で希釈してください。
6. 重度の腎不全または異常ヘモグロビン症など特定の病態にある場合、赤血球の溶解が遅くなる、不完全または不可能となる場合があります。この場合、染色する前に密度勾配 (例: Ficoll) によって、単核細胞を分離することをお勧めします (3)。

その他

例および参考文献については、添付資料を参照してください。

商標

Beckman Coulter、図案化されたロゴ、Flow-Check、Flow-Set、IOTest、Navios および VersaLyse は、Beckman Coulter, Inc. の商標であり、USPTO に登録されています。

Pacific Blue は、Molecular Probes, Inc. の商標です。

製造元:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
カスタマーサービス: (33) 4 91 17 27 27

IMMUNOTECH SAS
Beckman Coulter
Beckman Coulter グループ会社
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France (フランス)

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
無断転載禁止。

ベックマン・コールター株式会社

IOTest
CD11b-Pacific Blue

REF B36296
50 테스트; 0.5 mL
10 µL / 테스트

IOTest
결합 항체
IVD

CE

한국어	사양
특이성	CD11b
클론	Bear1
융합 세포	SP2/0 x balb/c
면역원	Purified human monocytes
면역글로불린	IgG1
종	쥐
소스	체외 배양 융합 세포의 복수 유체(ascites fluid) 또는 상청
정제	친화성 크로마토그래피
형광 색소	Pacific Blue
분자비	Pacific Blue / Ig: 6 - 8
λ 흥분	405 nm
최대 방출	455 nm
완충액	PBS pH 7.2 + 2 mg / mL BSA 및 0.1% NaN_3

용도
이 형광 색소 결합 항체를 이용한 유동 세포 분석법으로 인체 말초 혈액에 있는 CD11b 항체를 표현하는 세포군을 식별할 수 있습니다.

원리
이 테스트는 백혈구 수로 표현되는 항원결정기에 결합하는 특정 단일 클론 항체의 기능을 기반으로 합니다.
백혈구의 특정 염색은 IOTest 시약을 사용하여 표본을 배양함으로써 수행됩니다. 적혈구는 세포 용해에 의해 제거되며 이 프로세스로 영향을 받지 않는 백혈구는 유세포 측정기에 의해 분석됩니다.
유세포 측정기는 세포의 광 확산과 형광 발광을 측정합니다. 이를 통해 직교 광 확산(측방 산란 또는 SS)과 협각 광 확산(전방 산란 또는 FS)의 상관 관계를 보여주는 히스토그램에 정의된 전자 창 내에서 관심 개체군의 한계를 정할 수 있습니다. 세포 측정기에서 사용할 수 있는 여러 파라미터 중 둘을 결합하는 다른 히스토그램은 사용자가 선택한 용도에 따라 게이팅 단계에서 지원 자료로 사용할 수 있습니다.

임상 응용 예
CD11b는 혈액 장애를 검출하고 특성을 정의하는 데 유용합니다 (4-6). CD11b 분자는 급성 단핵구성 백혈병과 급성 단구성 백혈병에서 나타납니다. 비정상적인 CD11b 표현은 골수이형성증후군(MDS)에서 예후적인 의미를 갖습니다. CD11b가 나타나는 골수 세포의 비율이 낮은 환자는 CD11b가 나타나는 골수 세포가 53%보다 많은 환자에 비해 급성 골수성 백혈병으로 진행될 가능성이 높습니다 (4). 또한 CD11b는 때때로 T 세포 대형 과립성 림프 백혈병에서 관찰될 수 있습니다 (7).

보관 및 안정성
결합액은 용기를 연 후 직사광선을 피해 2 – 8°C 온도에서 보관해야 합니다.
밀폐된 용기의 안정성: 용기에 기재된 유통 기한을 참조하십시오.
개방된 용기의 안정성: 시약의 유통 기한은180일입니다.

시약 내용물
농도: 로트별 분석 증명서
(www.beckmancoulter.com)를 참조하십시오.

성능 저하 증거
시약의 물리적 외형이 변형되는 경우 성능 저하를 나타낼 수 있으므로 시약을 사용해서는 안 됩니다.
포장이 변형되거나 획득 데이터가 일부 성능 변화를 보여주는 경우에는 현지 판매업체에 문의하거나 다음 이메일 주소를 이용하십시오.
immuno-techsup@beckmancoulter.com

주의 사항
1.유통 기한이 지난 시약은 사용하지 마십시오.
2.시약을 얼리지 마십시오.
3.상온(18 – 25°C)이 되면 사용하십시오.
4.빛 노출을 최소화하십시오.
5. 시약의 세균 오염을 방지하십시오. 잘못된 결과가 나타날 수 있습니다.
6. 아지드화 나트륨(NaN_3)이 함유된 항체 용액은 주의해서 다루어야 합니다. 복용하거나 피부, 점막, 눈에 닿아서는 안 됩니다.
   또한 산성 매질에 함유된 아지드화 나트륨은 잠재적 위험 물질인 히드라조산을 만들어낼 수 있습니다. 시약을 폐기할 때는 금속 파이프 내 아지드화 나트륨 축적과 폭발 위험을 방지하기 위해 다량의 물에 희석한 후 배수 시설로 흘려보내야 합니다.
7. 모든 혈액 표본은 잠재적 전염 물질로 간주해야 하며 취급 시 주의가 요구됩니다(특히 보호 장갑, 보호복, 보호경 착용).
8. 절대로 입으로 채취하거나 피부, 점막, 눈에 표본이 닿아서는 안 됩니다.
9. 취급 시 사용한 혈액 튜브와 폐기 물질은 일회용 소각 용기에 넣어 폐기해야 합니다.
10. 시약과 폐기물은 현지 규정에 따라 처리해야 합니다.

표본
정맥혈은 혈액 응고 방지제로 EDTA 염을 포함하는 살균 튜브를 사용해야 채취해야 합니다.
표본은 상온(18 – 25°C)에 보관해야 하며 흔들어서는 안 됩니다. 표본은 테스트 표본을 채취하기 전에 부드럽게 저어 균질화된 상태로 만들어야 합니다.
표본은 정맥 천자 후 24시간 이내에 분석해야 합니다.

방법론
제공되지 않은 필요 도구 및 물질
- 표본 채취 튜브와 표본 채취에 필요한 물질.
- 자동 피펫(10, 100 및 500 µL용 일회용 팁).
- 플라스틱 용혈 튜브.
- 캘리브레이션 비드:
  Flow-Set Pro Fluorospheres (Ref. A63492)
  Flow-Check Pro Fluorospheres (Ref. A63493)
- 세포 용해 후 세척 단계의 적혈구 용해 시약. 예: VersaLyse (참조 A09777).
- 백혈구 고정 시약. 예: IOTest 3 고정 용액 (참조 A07800).
- 쥐 아이소타입 통제Pacific Blue: IOTest 시약 (참조A74764).
- 완충제(PBS: 0.01 M 인산 나트륨; 0.145 M 염화 나트륨; pH 7.2).
- 원심분리기.
- 자동 교반기(볼텍스 유형).
- 유세포 측정기.

절차
분석된 각 표본과 테스트 튜브마다, 아이소타입 통제하에 세포가 혼합되는 하나의 제어 튜브가 권장됩니다(참조 A74764).

1. 각 테스트 튜브에 10 µL의 특정 IOTest 결합 항체를 추가하고 각 제어 튜브에 10 µL의 아이소타입 통제를 추가합니다.
2. 두 튜브에 모두100 µL의 테스트 표본을 추가합니다. 튜브를 부드럽게 저어줍니다.

3. 직사광선을 피해 15 – 20분 동안 상온(18 – 25°C)에서 배양합니다.
4. 그런 다음 사용하는 세포 용해 시약 권장 사항에 따라 적혈구 세포 용해를 수행합니다.

   예를 들어 VersaLyse(참조 A09777)를 사용하려는 경우 책자 내용을 참조하여 즉석에서 준비된 1 mL의 “고정 및 세포 용해” 혼합물 추가에 대한 "수반 고정" 절차를 따릅니다. 1초 동안 즉시 저은 후 직사광선을 피해 상온에서 10분 동안 배양합니다.
5. 상온에서 5분 동안 150 x g 상태로 원심분리기를 작동합니다.
6. 흡입 방식으로 상청액을 제거합니다.
7. 3 mL의 PBS를 사용하여 세포 펠렛을 재부유시킵니다.
8. 5단계를 반복합니다.
9. 흡입 방식으로 상청액을 제거하고 다음을 사용하여 세포 펠렛을 재부유시킵니다.
   - 조제용 물질을24 시간 미만 보존하려는 경우 PBS 0.5 mL + 0.1%의 포름알데히드. (0.1%의 포름알데히드 PBS는 12.5 µL의 IOTest 3 고정 용액(참조 A07800)을 1 mL의 PBS에서 10배 농도로 희석시켜 얻을 수 있습니다.)
   - 조제용 물질을2 시간 이내에 분석하려는 경우 포름알데히드가 없는 0.5 mL의 PBS.

참고: 조제용 물질은 항상 직사광선을 피해 2 – 8°C 온도에서 보관해야 합니다.

성능

성능 데이터는 위에서 설명한 혈액 응고 방지제로 EDTA 염을 사용하여 이전에 살균 튜브에서 수집되고 18 – 25°C 온도에서 보관된 정맥천자 후 24 이내 견본에 대한 절차를 사용하여 얻을 수 있습니다. 분석은 면역 염색 후 24시간 이내에 수행됩니다.

특이성

CD11b 항원은 알파-M 인테그린 체인, Mac-1, CR3, iC3bR 또는 Mo1과 같은 여러 가지 다른 이름으로도 불립니다 (8, 9). CD11b 항원은 환원/비환원 조건에서 각각 170 - 165 kDa의 유형 I 필수 막전위 당단백질입니다. CD11b는 19개의 잠재적 N-글리코실화 영역을 보여줍니다 (8).

세포 표면에 CD11b 체인을 표현하려면 CD18 항원(beta2 인테그린 체인이라고도 함)이 있어야 합니다. 이러한 두 소 단위가 결합되어 CD11b/CD18 인테그린(CD18 베타 체인과 서로 다른 4개의 CD11 알파 체인이 결합되어 만들어지는 4개의 인테그린 헤테로다이머 중 하나)을 생성합니다. CD11b/CD18(αMβ2) 인테그린은 Mac-1이라고도 합니다. CD11b/CD18 인테그린은 폭넓은 리간드 결합 성능을 보유하고 있으며 다른 리간드 중에 CD23, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), ICAM-4, 보체 성분 iC3b, 피브리노겐, LPS/LBP(리포 다당류(LPS) 및 LPS 결합 단백질)를 인식할 수 있습니다 (8). 또한 CD16 또는 CD14와 같은 GPI 닻형 표면 분자와 CD11b/CD18의 막내 상호 작용 증거가 있습니다 (10). 이러한 상호 작용은 GPI 결합 막 수용체의 막관 신호 및 반응 기능의 이유가 될 수 있습니다. CD11b/CD18은 NK 림프구, 호중구, 단핵 백혈구 및 대식 세포에서 뚜렷하게 표현됩니다.

BEAR1 단일 클론 항체 (9)는 1996년 일본 고베에서 개최된 인체 백혈구 분화 항원에 대한 제6차 HLDA 워크샵에서 CD11b에 부여되었습니다(WS 코드: A015, 섹션 접합 분자) (8).

정밀도

긍정적 목표의 염색율은 10개의 복제 본에서 같은 날 실행되고 동일한 세포 측정기를 사용하는 2개의 전혈 표본을 사용하여 판별되었습니다. 얻어진 결과는 아래 표에 요약했습니다.

긍정적 목표	번호	평균 (%)		SD		CV (%)	
		기증자 1	기증자 2	기증자 1	기증자 2	기증자 1	기증자 2
림프구 CD11b +	10	27.94	28.46	0.84	0.57	2.99	2.01
단핵 백혈구 CD11b +	10	99.55	96.02	0.25	0.73	0.25	0.76
과립구 CD11b +	10	99.99	99.99	0.01	0.01	0.01	0.01

검출 한계

CLSI EP17-A2, 임상 실험 측정 절차의 검출 능력 평가; 승인 지침 제2판에 따라 한 연구가 수행되었습니다 (1). 검출 한계(LOD)는 지속적으로 검출될 수 있는 분해 물질의 최저 농도입니다. 얻어진 결과는 아래 표에 요약했습니다.

긍정적 목표	검출 한계
림프구 CD11b +	2.0 Cells/ µL
단핵 백혈구 CD11b +	2.0 Cells/ µL
과립구 CD11b +	1.0 Cells/ µL

기술적 한계

1. 세포 측정기가 완벽하게 정렬되지 않은 경우, 형광 누출이 올바르게 보정되지 않은 경우 또는 영역 위치를 신중하게 지정하지 않은 경우 유세포 측정기가 잘못된 결과를 생성할 수 있습니다.
2. 이 시약은 "무세척" 세포 용해 기법에 최적화되지 않았으므로 세척 단계가 있는 RBC 세포 용해 기법을 사용하는 것이 좋습니다.
3. 사용된 절차가 기술 자료의 내용과 올바른 실험 관행을 따르는 경우 정확하고 재현 가능한 결과를 얻을 수 있습니다.
4. 이 시약의 결합 항체는 가장 정확한 특정 신호 대비 비특정 신호 비율을 제공하도록 캘리브레이션됩니다. 따라서 모든 테스트에서 시약 볼륨 대비 표본 볼륨 비율을 준수해야 합니다.
5. 하이퍼루코사이토시스의 경우에는 혈액을 PBS에 희석하여 약 5 x 10^9 백혈구/L 값을 얻어야 합니다 (2).
6. 심각한 신장부전증 또는 혈색소병증 같은 특정 질병 상태에서는 적혈구의 세포 용해가 느리거나 불완전하거나 불가능할 수도 있습니다. 이러한 경우에는 염색 전에 밀도구(예: Ficoll)를 사용하여 단핵 세포를 격리시키는 것이 좋습니다 (3).

기타

관련 예와 참조 자료는 부록을 참조하십시오.

상표

Beckman Coulter, 스타일 로고, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios 및 VersaLyse 은 Beckman Coulter, Inc.의 상표로 USPTO에 등록되어 있습니다.

Pacific Blue는 Molecular Probes, Inc.의 상표입니다.

다음에서 제작:

IMMUNOTECH SAS
A Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
고객 지원: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

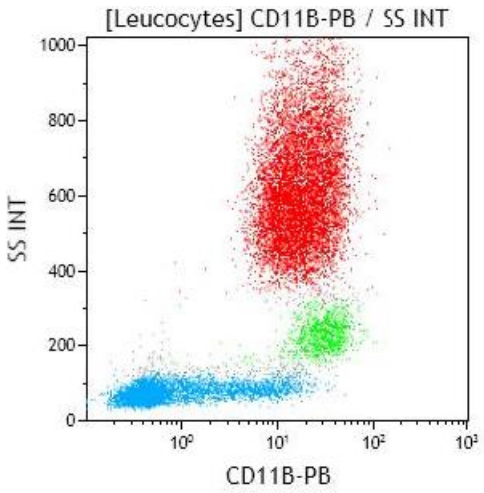
© 2014 Beckman Coulter, Inc.
저작권 본사 소유.

APPENDIX TO REF B36296

EXAMPLES

The graph below is biparametric representation (SS vs. Fluorescence Intensity) of lyzed normal whole blood sample.
Staining is with IOTest CD11b-Pacific Blue Conjugated Antibody (Ref. B36296).

For Pacific Blue conjugate acquisition is performed with a Beckman Coulter Navios flow cytometer equipped with the Navios analysis software



REFERENCES

1. EP17-A2 CLSI: Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition.
2. H42-A2 Vol.27 No. 16. P30. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline - Second Edition;
3. Ibrahim FF, Ghannam MM, Ali FM. "Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients". 2002. Ren Fail. Nov;24(6):779-90.
4. Elghetany MT., "Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes", 1998, Haematologica, 83, 1104-15.
5. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH., "Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting", 2001, Cytometry, 46, 23-7.
6. Maynadie M, Picard F, Husson B, Chatelain B, Cornet Y, Le Roux G, Campos L, Dromelet A, Lepelley P, Jouault H, Imbert M, Rosenwadj M, Verge V, Bissieres P, Raphael M, Bene MC, Feuillard J; "Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes", 2002, Blood, 100, 2349-56.
7. Chan, W.C., Catovsky, D., Foucar, K., Montsessat, E., "T-cell large granular lymphocyte leukaemia", 2001, "Pathology and Gentics - Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues", Edited by Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., and Vardiman, J.W., WHO Classification of Tumours, IARC Press, 197-198.
8. Hogg, N., "CD11b workshop panel report", 1997, Leucocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens. Kishimoto, T., et al, (WS Code: A015, Section: Adhesion Molecules), Eds., Garland Publishing, Inc., 345-347.
9. Morimoto, C., "Activation antigens: section report", 1995, Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press, 1097-1104.
10. Petty, R., Todd III, R.F., "Integrins as promiscuous signal transduction devices", 1996, Immunol. Today, 5, 17, 209-212.