BD Oncomark Anti-Kappa FITC/Anti-Lambda PE/ CD19 PerCP-Cy5.5

Кат. № 331355

1/2010 23-13712-01

IVD

CE

BD, логотип BD и другие товарные знаки являются собственностью компании Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
San Jose, CA 95131
Тел.: 877-232-8995
Факс: 408-954-2347
ClinicalApplications@bd.com

EC REP
BENEX Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare
Ирландия
Тел.: 353-61-472920
Факс: 353-61-472907

BD Biosciences
Поддержка клиентов в Европе
Тел.: 322-400-9895
Факс: 322-401-7094
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

1. НАЗНАЧЕНИЕ

BD Oncomark™ Anti-Kappa FITC/ Anti-Lambda PE*/CD19 PerCP-Cy5.5* предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro* на наличие и степень клональных расширений при В-лимфопролиферативных заболеваниях. Аномальные соотношения каппа/лямбда или интенсивность являются убедительным свидетельством клональных процессов.[1, 2] Количественный анализ анти-каппа/анти-лямбда/CD19 используется для диагностики гематологических заболеваний.[1, 2]

2. СОСТАВ

Анти-каппа, клон TB28-2, получают путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками мышей CB6 (BC57b x BALB/c), иммунизированных белком IgG-κ миеломы человека.

Анти-лямбда, клон 1-155-2, получают путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками мышей BALB C/J, иммунизированных белком IgA_1-λ миеломы человека.

CD19, клон SJ25C1,[3] получают путем гибридизации мышиных клеток Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками NALM1 + NALM16.

Анти-каппа и CD19 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG_1. Анти-лямбда состоит из тяжелых цепей и легких лямбда-цепей мышиного IgG_1.

* Патенты — PE: США 4 520 110; 4 859 582; 5 055 556; Европа 76 695; Канада 1 179 942.
PerCP: США 4 876 190.
Cy5.5: США 5 268 486; 5 486 616; 5 569 587; 5 569 766; 5 627 027.

Этот реагент поставляется в виде комбинации Anti-Kappa FITC, Anti-Lambda PE и CD19 PerCP-Cy5.5 в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего бычий сывороточный альбумин (БСА) и 0,1 % азида натрия.

ОСТОРОЖНО! Азид натрия вреден при приеме внутрь (R22). Хранить в недоступном для детей месте (S2). Держать вдали от пищи, напитков и корма для животных (S13). Использовать подходящую защитную одежду (S36). При попадании внутрь немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо смывать большим количеством воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно образование взрывоопасных условий.

Чистота антител:

- FITC, PE, PerCP-Cy5.5: ≤ 20 % свободного флуорофора на момент упаковки по результатам измерения методом эксклюзионной хроматографии (SEC).

3. ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ

Реагент стабилен до даты истечения срока годности, указанной на этикетке, при хранении при температуре от 2 до 8 °C. После истечения срока годности не использовать. Реагент не замораживать и не подвергать воздействию прямого солнечного света при хранении или инкубации с клетками. Наружная поверхность пробирки с реагентом должна быть сухой.

Не использовать реагент, если наблюдаются какие-либо изменения внешнего вида. Осадок или обесцвечивание свидетельствуют о нестабильности или порче.

4. НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

- Одноразовые полистироловые пробирки с крышками BD Falcon™ 12 x 75 мм (BD кат. № 352058) или эквивалентные.
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD; BD кат. № 343246 [США], 349444 [Европа]).
- Вихревая мешалка «вортекс».
- Лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution* (10-кратный) (BD кат. № 349202).

  Инструкции по разбавлению и предупреждения см. на вкладыше к продукту.
- Центрифуга.
- Раствор BD CellWASH™ (BD кат. № 349524) или промывочный фосфатно-солевой буфер (PBS) с 0,1 % азида натрия.
- Раствор BD CellFIX™ (BD кат. № 340181) или 1 % раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азида натрия.

  Хранить при температуре от 2 до 8 °C в бутыли из желтого стекла не более 1 недели.

  ОСТОРОЖНО! Формальдегид вреден при вдыхании и при контакте с кожей и токсичен при попадании внутрь (R20/21, 25). Он обладает раздражающим действием на глаза и

* Патенты США №№ 4 654 312; 4 902 613; 5 098 849.

кожу (R36/38). В случае попадания в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26). При продолжительном воздействии возможно развитие злокачественных новообразований. При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Возможный риск необратимых эффектов (R68). Может вызывать сенсибилизацию при контакте с кожей (R43). При использовании не принимать пищу и напитки (S20).

- Правильно оборудованный цитометр.

  Длина волны возбуждающего лазера проточных цитометров должна быть установлена на 488 нм, они должны быть оснащены детекторами светорассеяния и соответствующей флуоресценции и иметь соответствующее аналитическое программное обеспечение для сбора и анализа данных. См. инструкции в руководстве по эксплуатации Вашего прибора.

5. ОБРАЗЦЫ

BD Oncomark Anti-Kappa FITC/ Anti-Lambda PE/CD19 PerCP-Cy5.5 можно применять для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии с периферической кровью и аспиратами костного мозга, собранными в EDTA (например, в пробирках BD Vacutainer™). Различные типы образцов имеют разные требования к условиям хранения и ограничения, которые необходимо учесть перед забором и анализом.[4, 5]

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования[6, 7] и требуют утилизации с соблюдением надлежащих мер предосторожности в соответствии с федеральными, региональными и местными нормативами. Не выполнять пипетирование ртом. Использовать надлежащую защитную одежду и перчатки.

6. ПРОЦЕДУРА

Необходимо оценивать жизнеспособность образцов и установить пороговое значение. Рекомендуется пороговое значение не менее 80 % жизнеспособных клеток.[4]

Во избежание интерференции сыворотки при использовании этих реагентов необходимо предварительно промыть образец по меньшей мере 25 добавочными объемами однократного PBS с 0,1 % азида (например 48 мл однократного PBS с азидом на 2 мл цельной крови). Тщательно перемешайте. Осадите клетки центрифугированием и ресуспендируйте в однократном PBS с 0,1 % азида до первоначального объема.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark Anti-Kappa/Anti-Lambda/ CD19 к 100 мкл цельной крови или предварительно профильтрованного костного мозга в пробирке 12 x 75 мм.
2. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте от 15 до 20 минут в темноте при комнатной температуре (от 20 до 25 °C).
3. Добавьте 2 мл однократного BD FACS Lysing Solution.
4. Аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте 10 минут в темноте при комнатной температуре.
5. Центрифугируйте при 300 x *g* в течение 5 минут.

   Удалите супернатант.

6. Добавьте от 2 до 3 мл раствора BD CellWASH (или промывочного буфера) и центрифугируйте при 200 x *g* в течение 5 минут.

   Удалите супернатант.

7. Добавьте 0,5 мл раствора BD CellFIX (или 1 % раствора параформальдегида) и тщательно перемешайте.

   Храните до анализа при температуре от 2 до 8 °C.

Окрашенные образцы должны быть проанализированы в течение 24 часов после окрашивания.

Проточная цитометрия

1. Настройте прибор в соответствии с рекомендациями производителя.

   Ежедневно выполняйте анализ контрольного образца здорового взрослого донора или коммерческого контрольного образца цельной крови для оптимизации настроек прибора и в целях контроля качества системы.

2. Прежде чем вводить клетки в проточный цитометр, тщательно перемешайте их в вихревой мешалке на низких оборотах, чтобы уменьшить агрегацию.[8]

3. Загрузите образец в проточный цитометр.

4. Соберите и проанализируйте данные в режиме списка с использованием соответствующего программного обеспечения.

5. Начертите гейт вокруг целевой популяции на точечном графике FSC и SSC (рис. 1).

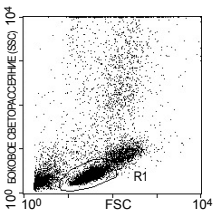
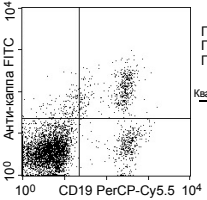


Рис. 1. Точечный график FSC и SSC

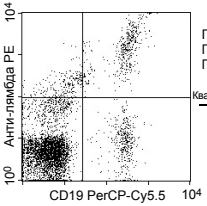
6. Произведите анализ целевого антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

7. Начертите квадранты и рассчитайте статистические данные (рис. 2).



Гейт: G1
Параметр X: CD19 PerCP-Cy5.5 (Log)
Параметр Y: Анти-каппа FITC (Log)

Квадрант	Результат подсчета	% гейтированных	% общий
UL	173	3,75	1,73
UR	369	8,01	3,69
LL	3692	80,12	36,92
LR	374	8,12	3,74



Гейт: G1
Параметр X: CD19 PerCP-Cy5.5 (Log)
Параметр Y: Анти-лямбда PE (Log)

Квадрант	Результат подсчета	% гейтированных	% общий
UL	252	5,47	2,52
UR	365	7,92	3,65
LL	3608	78,30	36,08
LR	383	8,31	3,83

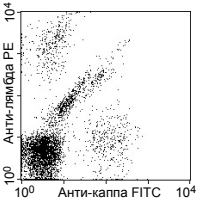


Рис. 2. Начерченные квадранты, отображающие статистические данные

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Анти-каппа является специфичным для легких каппа-цепей иммуноглобулина человека.[9]

Анти-лямбда является специфичным для легких лямбда-цепей иммуноглобулина человека.[9]

CD19 (SJ25C1) распознает антиген массой 90 килодальтон (кДа), присутствующий на В-лимфоцитах человека.[3, 10]

Распределение антигена

Иммуноглобулин содержащие легкие каппа-цепи присутствуют примерно на 60 % нормальных В-лимфоцитов и на $Ig\kappa^+$ опухолевых клеток.[11—17]

Иммуноглобулин содержащие легкие лямбда-цепи присутствуют примерно на 40 % нормальных В-лимфоцитов и на $Ig\lambda^+$ опухолевых клеток.[11—17]

Антиген CD19 присутствует примерно на от 7 до 23 % лимфоцитов периферической крови человека[18] и на спленоцитах.[19] Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека на практически всех стадиях созревания.[3, 20] CD19 не реагирует с покоящимися и активированными Т-лимфоцитами, гранулоцитами и моноцитами.[3, 20]

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Применение терапевтических моноклональных антител для лечения пациентов может влиять на распознавание целевых антигенов данным реагентом. Это следует учитывать при анализе образцов от пациентов, подвергающихся такому лечению. BD Biosciences не исследовала влияние наличия терапевтических антител на рабочие характеристики данного реагента.

Использование комбинации данного реагента для диагностической оценки гематологических нарушений должно проводиться в контексте тщательного анализа иммунофенотипирования, в том числе включая другие соответствующие маркеры.

При проведении процедур с реагентами BD Oncomark необходимо придерживаться инструкции по эксплуатации соответствующего прибора, программного обеспечения и процедур контроля качества, используемых в Вашей лаборатории.

Рабочие характеристики реагентов определялись в основном с использованием образцов, обработанных EDTA. При применении других антикоагулянтов характеристики реагентов могут быть другими.

Образцы с большим количеством нежизнеспособных клеток могут давать ошибочные результаты из-за селективной гибели популяций и повышенного неспецифического связывания антител с нежизнеспособными клетками.

ГАРАНТИЯ

Для продаваемых согласно данным условиям продуктов гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке или маркировке продукта на момент доставки заказчику. Не существует никаких гарантий, явных или подразумеваемых, выходящих за рамки описания на этикетке продукта. Вся ответственность компании BD ограничивается либо заменой продуктов, либо возмещением цены покупки. BD не несет ответственности за повреждение имущества, получение травм или экономический ущерб, вызванные продуктом.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблема	Возможная причина	Решение
Плохое разделение дебриса и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками и тромбоцитами	Подготовить и окрасить другой образец.
	Неаккуратное приготовление клеточного образца	Проверить жизнеспособность клеток; центрифугировать клетки на меньших оборотах.
	Неподходящие настройки прибора	Выполнить соответствующие процедуры настройки прибора; при необходимости оптимизировать настройки.
Слабое или тусклое окрашивание	Слишком высокая концентрация клеток на этапе окрашивания	Проверить и откорректировать концентрацию клеток или объем образца; окрасить свежий образец.
	Недостаточное количество реагента	Повторить окрашивание с большим количеством антител.
	Клетки анализировались позднее, чем через 24 часа после окрашивания	Повторить окрашивание на свежем образце; провести анализ без задержки.
Клеток мало или нет вообще	Слишком низкая концентрация клеток	Приготовить новый образец с большей концентрацией; повторить окрашивание и анализ.
	Неисправный цитометр	Проверить и устранить неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weinberg DS, Pinkus GS, Ault KA. Cytofluorometric detection of B cell clonal excess: a new approach to the diagnosis of B cell lymphoma. *Blood*. 1984;63:1080-1087.
2. Têtu B, Manning JT, Ordóñez NG. Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies directed against immunoglobulin light and heavy chains in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1985;85:25-31.
3. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
5. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P, Jr., Lovett EJ, Schwartz A. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30:214-230.
6. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections–Second Edition; Approved Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2001. NCCLS document M29-A2.
7. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
8. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
9. Kubagawa H, Gaithings WE, Levitt D, Kearney JF, Cooper MD. Immunoglobulin isotype expression of normal pre-B cells as determined by immunofluorescence. *J Clin Immunol*. 1982;2:264.
10. Moldenhauer G, Dörken B, Schwartz R, Pezzutto A, Knops J, Hammerling GJ. Analysis of ten B lymphocyte-specific workshop monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:61-67.

11. Chung J, Gong G, Huh J, Khang SK, Ro JY. Flow cytometric immunophenotyping in fine-needle aspiration of lymph nodes. *J Korean Med Sci*. 1999;14:393-400.
12. Zardawi IM, Jain S, Bennett G. Flow-cytometric algorithm on fine-needle aspirates for the clinical workup of patients with lymphadenopathy. *Diagn Cytopathol*. 1998;19:274-278.
13. Davidson B, Risberg B, Berner A, Smeland EB, Torlakovic E. Evaluation of lymphoid cell populations in cytology specimens using flow cytometry and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol*. 1999;8:183-188.
14. Braylan RC, Benson NA, Iturraspe J. Analysis of lymphomas by flow cytometry: current and emerging strategies. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;677:364-378.
15. Johnson A, Cavallin-Stahl E, Akerman M. Flow cytometric light chain analysis of peripheral blood lymphocytes in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*. 1985;52(2):159-165.
16. Letwin BW, Wallace PK, Muirhead KA, Hensler GL, Kashatus WH, Horan PK. An improved clonal excess assay using flow cytometry and B-cell gating. *Blood*. 1990;75:1178-1185.
17. Geary WA, Frierson HF, Innes DJ, Normansell DE. Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non- Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. *Mod Pathol*. 1993;6:155-161.
18. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
19. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
20. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood*. 1987;70:1316-1324.