



BD Oncomark Anti-Lambda FITC/Anti- Kappa PE/CD20 PerCP- Cy5.5

Кат. № 331356

1/2010

23-13750-01



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



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-Lambda FITC/Anti-Kappa PE/CD20 PerCP-Cy5.5 предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro* с целью определения наличия и степени клональных расширений в линиях В-клеток. Аномальные соотношения каппа/лямбда или интенсивность являются убедительным свидетельством клональных процессов.^{1—3} Количественный анализ с использованием Anti-Lambda/Anti-Kappa/CD20 используется для диагностики гематологических заболеваний.^{1—3}

2. СОСТАВ

Anti-Lambda, клон 1-155-2, получают путем гибридизации клеток мышинной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками мышей BALB C/J, иммунизированных белком IgA₁-λ миеломы человека.

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

CD20, клон L27, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками лимфобластомы LB.

Anti-Lambda состоит из тяжелых цепей и легких лямбда-цепей мышинного IgG₁. Anti-Kappa и CD20 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышинного IgG₁.

Этот реагент поставляется в виде комбинации Anti-Lambda FITC, Anti-Kappa PE и CD20 PerCP-Cy5.5 в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего бычий сывороточный альбумин (BCA) 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 Electronic Pipette; BD кат. № 646539, или эквивалентные).
- Вихревая мешалка «вортекс».
- Лизирующий раствор BD FACST™ 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 бутылки 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 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-Lambda FITC/Anti-Kappa PE/CD20 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 оценить 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 % азидом (например, 48 мл однократного PBS с азидом на 2 мл цельной крови). Тщательно перемешайте. Осадите клетки в центрифуге и вновь внесите их в однократный PBS с 0,1 % азидом с изначальным объемом.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark Anti-Lambda/Anti-Kappa/CD20 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.

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

Удалите супернатант.

- 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

- Настройте цитометр 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.

- Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.⁸
- Загрузите образец в проточный цитометр.
- Соберите и проанализируйте данные в режиме списка с использованием соответствующего ПО.
- Начертите гейт вокруг целевой популяции на точечном графике FSC и SSC (рис. 1).

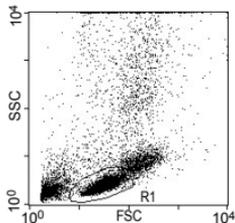


Рис. 1. Точечный график FSC и SSC

- Произведите анализ целевого антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.
- Начертите квадранты и рассчитайте статистические данные (рис. 2).

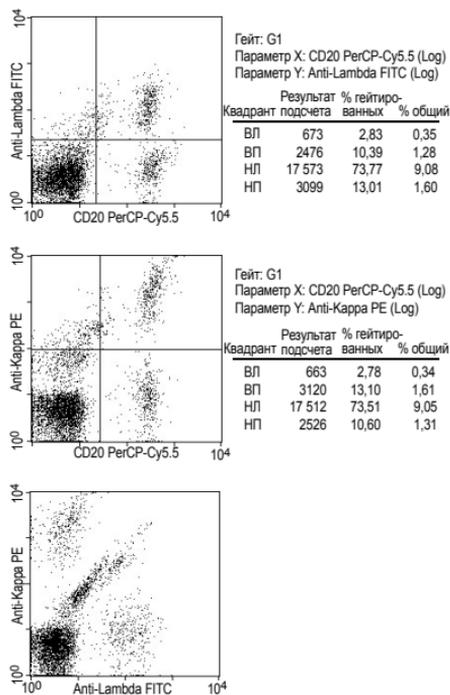


Рис. 2. Начерченные квадранты, отображающие статистические данные

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Anti-Lambda является специфичным для легких лямбда-цепей иммуноглобулина человека.⁹

Anti-Kappa является специфичным для легких каппа-цепей иммуноглобулина человека.⁹

Антиген CD20 представляет собой фосфопротеин с молекулярной массой 35 или 37 килодальтон (кДа), в зависимости от степени фосфорилирования.¹⁰ Антиген не гликозилируется.¹⁰

Распределение антигена

Иммуноглобулины, содержащие легкие лямбда-цепи, присутствуют примерно на 40 % нормальных В-лимфоцитов и на IgL⁺ опухолевых клеток.^{2, 3, 11—15}

Иммуноглобулины, содержащие легкие каппа-цепи, присутствуют примерно на 60 % нормальных В-лимфоцитов и на Igk⁺ опухолевых клеток.^{2, 3, 11—15}

Антиген CD20 экспрессируется на В-лимфоцитах синхронно с экспрессией поверхностного IgM.^{10, 16} Антиген присутствует как на покоящихся, так и на активированных В-лимфоцитах, но исчезает перед дифференциацией в плазмочиты.¹⁰ Антиген CD20 обнаруживается как в мантийной, так и в центральной зародышевой зоне вторичных фолликулов лимфоидной ткани и может экспрессироваться на фолликулярных дендритных клетках (FDC) зародышевых центров.¹⁰ Низкоуровневая экспрессия антигена CD20 обнаруживалась в субпопуляции Т-лимфоцитов.¹⁷

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 крови, обработанной 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 продаваемого согласно данным условиям продукта гарантируется только соблюдение количества и содержимого, указанных на этикетке 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 дегриза и лимфоцитов	Взаимодействие клеток с другими клетками и тромбоцитами	Подготовить и окрасить другой образец.
	Неаккуратное приготвление клеточного образца	Проверить жизнеспособность клеток; центрифугировать клетки на меньших оборотах.
	Неподходящие настройки прибора	Строго выполнить процедуры настройки прибора; если необходимо, оптимизировать настройки прибора.
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	Подготовить свежий образец с более высокой концентрацией; повторить окрашивание и анализ.
	Неисправный цитометр	Проверить и устранить неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- 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.
- 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.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD20. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. 1 ed. New York, NY: Oxford University Press; 1989:46-48.
- 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.
- 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.
- 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. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (Pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry*. 1993;14:196-204.