



# BD Oncomark CD15 FITC/CD34 PE

Кат. № 333178

7/2010

23-13754-01



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™ CD15 FITC/CD34 PE предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro*. Количественные анализы с использованием CD15/CD34 применяются в диагностике гематологических заболеваний.<sup>1—5</sup>

## 2. СОСТАВ

CD15, клон MMA, получают путем гибридизации клеток мышиной миеломы P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных гистиоцитарной клеточной линией U-937.

CD34 (Anti-HPCA<sup>\*</sup>-2), клон 8G12, получают путем гибридизации мышиных клеток Sp2/0-Ag14 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных линией клеток KG-1a человека.<sup>6</sup>

CD15 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgM. CD34 (Anti-HPCA-2) состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG<sub>1</sub>.

Этот реагент поставляется в виде комбинации CD15 FITC и CD34 PE в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего желатин 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 обратиться за медицинской помощью и покажите данную упаковку или этикетку (S46). При взаимодействии с кислотами выделяется высокотоксичный газ (R32). Азидные соединения при утилизации необходимо

\* Антиген клетки-предшественника человека.

смывать большим количеством воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно образование взрывоопасных условий.

Чистота антител.

- FITC, PE:  $\leq 20\%$  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 эквивалентная).
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette, BD кат. № 646539, или эквивалентная).
- Вихревая мешалка «вортекс».
- Лизирующий раствор BD FACSTM 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). При контакте с кожей может вызывать сенсибилизацию (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 CD15 FITC/CD34 PE 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.<sup>7, 8</sup>

**ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования<sup>9, 10</sup> 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.<sup>7</sup>

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 в центрифуге и вновь внесите их

в однократный PBS с 0,1 % азида натрия с изначальным объемом.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark CD15/CD34 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 цитометр в соответствии с рекомендациями производителя.

Ежедневно выполняйте анализ контрольного образца здорового взрослого донора или коммерческого

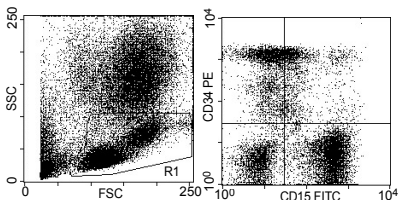
контрольного образца цельной крови для оптимизации настроек прибора и в целях контроля качества системы.

2. Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.<sup>11</sup>

3. Запустите анализ образца в проточном цитометре.

Удостоверьтесь, что все популяции расположены в пределах шкалы. В случае необходимости оптимизируйте настройки прибора.

4. Получите и проанализируйте данные в режиме списка с использованием соответствующего ПО.
5. На соответствующих графиках при помощи комбинации гейтов, областей или квадрантов изолируйте целевую популяцию (рис. 1).



**Рис. 1.** Точечные графики, отображающие область R1 и квадранты

6. Определите экспрессию антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

## 7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Специфичность

CD15 распознает миеломоноцитарный антиген человека лакто-N-фукопентоза III.<sup>12</sup>

Антиген CD34 — одноцепочечный трансмембранный гликопротеин

молекулярной массой от 105 до 120 килодальтон (кДа). Данный антиген связан с кроветворными клетками-предшественниками человека и является дифференцировочным стадийноспецифическим антигеном лейкоцитов.<sup>6, 13—17</sup> Anti-HPCA-1 и Anti-HPCA-2 (клон 8G12) распознает два различных эпитопа CD34. Было определено по меньшей мере три эпитопа.<sup>6, 15</sup> Клон 8G12 распознает эпитоп класса 3.

### Распределение антигена

Антиген CD15, присутствующий на более чем 95 % зрелых эозинофилов и нейтрофилов периферической крови, в малой плотности присутствует на циркулирующих моноцитах.<sup>18</sup>

Антиген CD34 присутствует на незрелых кроветворных клетках-предкурсорах и всех кроветворных колониеобразующих клетках в костном мозге и крови.<sup>14, 17</sup> Антиген CD34 также находится на эндотелиальных клетках капилляров и приблизительно на 1 % тимоцитов человека.<sup>14, 19</sup> Нормальные лимфоциты, моноциты, гранулоциты и тромбоциты периферической крови не экспрессируют антиген CD34.<sup>6, 14, 17</sup> Плотность антигена CD34 выше на ранних кроветворных клетках-предшественниках и уменьшается по мере их созревания. Антиген отсутствует на окончательно дифференцированных кроветворных клетках.<sup>14, 20, 21</sup>

## 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. В компании BD Biosciences не проводились

исследования влияния 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 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                                      | 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.                                             |
| Клеток мало или нет вообще             | Клетки анализировались позднее, чем через 24 часа после окрашивания | Повторить окрашивание на свежем образце; провести анализ без задержки.                           |
|                                        | Слишком низкая концентрация клеток                                  | Подготовить свежий образец с более высокой концентрацией; повторить окрашивание и анализ.        |
|                                        | Неисправный цитометр                                                | Проверить и устранить неисправность прибора.                                                     |

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terstappen LWM, Safford M, Könemann S, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia*. 1992;6:70-80.
2. Reading CL, Estey EH, Huh YO, et al. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1993;81(11):3083-3090.
3. Venditti A, Del Poeta G, Stasi R, et al. Triple immunofluorescence evaluation of CD15, CD34 and class II expression by flow cytometry in normal and leukemic bone marrows. *Haematologica*. 1993;78:359-363.
4. Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia*. 1995;9:993-998.
5. Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica*. 1999;84(5):405-412.
6. Lansdorp PM, Dougherty GJ, Humphries RK. CD34 epitopes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:826-827.
7. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
8. 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.
9. *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.
10. 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.
11. 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.
12. Skubitz K, Balke J, Ball E, et al. Report on the CD15 cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:800-805.
13. 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.
14. Civin CI, Trischmann TM, Fackler MJ, et al. Report on the CD34 cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:818-825.
15. Peschel C, Köller U. Cluster report: CD34. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:817-818.
16. Lansdorp P, Sutherland H, Eaves C. Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34<sup>+</sup> hemopoietic cells from human bone marrow. *J Exp Med*. 1990;172:363-366.
17. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hemopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133:157-165.
18. Hanjan SN, Kearney JF, Cooper MD. A monoclonal antibody (MMA) that identifies a differentiation antigen on human myelomonocytic cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1982;23:172-188.
19. Kurtzberg J, Denning SM, Nycum LM, Singer KH, Haynes BF. Immature human thymocytes can be driven to differentiate into nonlymphoid lineages by cytokines from thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:7575-7579.
20. Terstappen LWM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> progenitor cells. *Blood*. 1991;77:1218-1227.
21. Civin C, Banquerigo M, Strauss L, Loken MR. Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Characterization of MY-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol*. 1987;15:10-17.