



BD Oncomark

CD38 FITC/CD56PE/ CD19 Percp-CY5.5

Кат. № 333173

7/2010

23-13731-02



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

Реагент BD Oncomark™ CD38 FITC/CD56 PE/CD19 PerCP-Cy5.5 предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro* нормальных и аномальных плазматических клеток.¹⁻⁴ Плазматические клетки обычно дают яркое свечение с CD38.⁵ Клетки, дающие яркое свечение с CD38, с фенотипами CD56 и CD19 могут различаться при различных заболеваниях плазматических клеток.^{4, 6, 7} Анализ с использованием CD38/CD56/CD17 применяется в диагностике гематологических заболеваний.¹⁻⁴

2. СОСТАВ

CD38, клон HB7,⁸ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных клеточной линией JLAB.

CD56, клон NCAM16.2,⁹ получают путем гибридизации клеток мышей P3X-63-Ag8.653 с клетками лимфатических узлов мышей линии BALB/c, иммунизированных иммуноаффинно-обогащенными NCAM (нейрональными молекулами клеточной адгезии) головного мозга взрослого человека.

CD19, клон SJ25C1,¹⁰ получают путем гибридизации мышинных клеток Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками NALM1 + NALM16.

CD38 и CD19 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышинового IgG₁. CD56 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышинового IgG_{2b}.

Этот реагент поставляется в виде комбинации CD38 FITC, CD56 PE и CD19 PerCP-Cy5.5 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 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: $\leq 20\%$ свободного флуорофора на момент упаковки по результатам измерения методом 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 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 % азид натрия.
- Раствор BD CellFIX™ (BD кат. № 340181) или 1 % раствор параформальдегида в PBS с 0,1 % азид 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 сенсibilизацию при контакте с кожей (R43). При использовании не принимать пищу и напитки (S20).

- Правильно оборудованный цитометр.

Проточный цитометр должен быть оснащен возбуждающим лазером с длиной волны 488 нм и детекторами светорассеяния и соответствующей флуоресценции, а также иметь соответствующее аналитическое программное обеспечение для сбора и анализа данных. См. инструкции в руководстве по эксплуатации Вашего прибора.

5. ОБРАЗЦЫ

BD Oncomark CD38 FITC/CD56 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.^{11, 12}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{13, 14} 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. Рекомендуются пороговое значение не менее 80 % жизнеспособных клеток.¹¹

Во избежание влияния сыворотки на результаты анализа с использованием данного реагента, необходимо предварительно промыть образец однократным PBS с 0,1 % азида натрия в количестве, обеспечивающем увеличение объема образца как минимум в 25 раз (т. е. для промывки 2 мл цельной крови требуется 48 мл однократного PBS с азидом натрия). Тщательно перемешайте. Осадите клетки в центрифуге и вновь внесите их в однократном PBS с 0,1 % с изначальным объемом.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark CD38/CD56/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.

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

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

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.¹⁵
- Запустите анализ образца в проточном цитометре.

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

- Соберите и проанализируйте данные в режиме списка с использованием соответствующего ПО.
- После получения соответствующих диаграмм изолируйте целевую популяцию с использованием требуемой комбинации гейтов, областей или квадрантов (рис. 1).

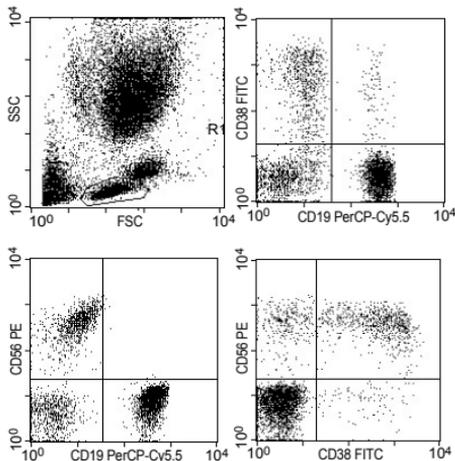


Рис. 1. Точечная диаграмма, отображающая область R1 и квадранты

- Определите экспрессию антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD38 распознает интегральный мембранный гликопротеин молекулярной массой 45 килодальтон (кДа) с белковой сердцевинной массой 35 кДа.¹⁶

CD56 (NCAM16.2) распознает внеклеточный иммуноглобулин-подобный домен, типичный для форм с тремя молекулярными массами (120, 140, и 180 кДа) молекулы адгезии нервных клеток (NCAM).^{17–19}

CD19 (SJ25C1) распознает антиген массой 90 кДа, присутствующий на В-лимфоцитах человека.^{10, 20}

Распределение антигена

Антиген CD38 экспрессируется практически на всех предшественниках В-лимфоцитов, плазмоцитах и тимоцитах.¹⁶ Он также присутствует на активированных Т-лимфоцитах, естественных киллерах (NK) и миелобластах.^{5, 8, 16} Антиген экспрессируется на ранних стадиях дифференциации Т- и В-лимфоцитов, теряется на промежуточных стадиях созревания, а затем вновь появляется во время последних стадий созревания.^{8, 16} Он также экспрессируется при острых Т- и В-лимфобластных лейкозах (ОЛЛ), лимфоме Беркитта, множественной миеломе и остром миелолейкозе (ОМЛ).^{21, 22}

Антиген CD56 присутствует примерно на 10—25 % лимфоцитов периферической крови.²³ Он присутствует практически на всех покоящихся или активированных CD16⁺ естественных киллерах (NK) и приблизительно на 5 % CD3⁺ лимфоцитов периферической крови.²³

Антиген CD19 присутствует примерно на 7—23 % лимфоцитов периферической крови человека²⁴ и на спленоцитах.²⁵ Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека практически на всех стадиях созревания.^{10, 26} CD19 не реагирует с покоящимися и активированными Т-лимфоцитами, гранулоцитами и моноцитами.^{10, 26}

8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Применение лекарственных препаратов, содержащих моноклональные антитела, 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 продаваемого согласно данным условиям продукта ГАРАНТИРУЕТСЯ ТОЛЬКО СОБЛЮЖДЕНИЕ 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 разрешение между дебрисом и лимфоцитами	Взаимодействие клеток с другими клетками и тромбоцитами	Подготовить и окрасить другой образец.
	Неаккуратное приготовление клеточного образца	Проверить жизнеспособность клеток; центрифугировать клетки на меньших оборотах.
Слабое или тусклое окрашивание	Неподходящие настройки прибора	Строго выполнить процедуры настройки прибора; если необходимо, оптимизировать настройки прибора.
	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	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.
Клеток мало или нет вообще	Неисправный цитометр	Проверить и исправить цитометр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kawano MM, Mihara K, Tsujimoto T, Huang N, Kuramoto A. A new phenotypic classification of bone marrow plasmacytosis. *Int J Hematol.* 1995;61:179-188.
- Harada H, Kawano MM, Huang N, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood.* 1993;81:2658-2663.
- Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol.* 1997;97:46-55.
- Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1998;152:1655-1665.
- Terstappen LWMM, Johnsen S, Segers-Nolten IMJ, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high resolution flow cytometry. *Blood.* 1990;76:1739-1747.
- Garcia-Sanz R, Orfao A, González M, et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood.* 1999;93:1032-1037.
- Van Camp B, Durie BGM, Spier C, et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood.* 1990;76:377-382.
- Tedder R, Clement L, Cooper M. Discontinuous expression of a membrane antigen (HB-7) during B lymphocyte differentiation. *Tissue Antigens.* 1984;24:140-149.
- Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1995;2:1367-1372.
- Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human B Lymphocytes.* New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia.* 1996;10:877-895.
- Stelzer GT, Marti G, Hurlley 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.

14. 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.
15. 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.
16. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD38. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:86.
17. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991;146:4421-4426.
18. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
19. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*. 1987;236:799-806.
20. 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. *Leucocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:61-67.
21. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:1588-1592.
22. Pezzutto A, Behm F, Callard RE, et al. Flow cytometry analysis of the B-cell blind panel: joint report. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:165-174.
23. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
24. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
25. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
26. 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.