



BD Oncomark CD5 FITC/CD10 PE/ CD19 PerCP-Cy5.5

Кат. № 331357

6/2010

23-13713-01



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™ CD5 FITC/CD10 PE*/CD19 PerCP-Cy5.5* предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro* нормального^{1, 2} и аномального^{3, 4} развития и дифференциации В-клеток. CD10 распознает раннюю субпопуляцию В-клеток⁵, CD5 распознает определенную субпопуляцию со зрелым фенотипом.⁶ CD19 присутствует практически на всех стадиях развития В-клеток.¹ Анализ экспрессии CD5, CD10 и CD19 может применяться при диагностике В-клеточных лимфом,^{7—9} острой лейкемии^{10, 11} и хронического лимфолейкоза.^{12—15}

2. СОСТАВ

CD5, клон L17F12,¹⁶ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей NS-1/Ag4 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных T-ALL клетками человека.

CD10, клон H110a,⁵ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей P3-63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных бластными клетками пациентов с острым CALLA лейкозом.

CD19, клон SJ25C1,¹⁷ получают путем гибридизации мышиных клеток Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками NALM1 + NALM16.

CD5 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG_{2a}. CD10 и

* 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.

CD19 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

Этот реагент поставляется в виде комбинации CD5 FITC, CD10 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 обратиться 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. № 646539, или эквивалентные).
- 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 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

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

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.

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 CD5 FITC/CD10 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.^{18, 19}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{20, 21} 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.¹⁸

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 CD5/CD10/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 °C.

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

Проточная цитометрия

- Настройте прибор в соответствии с рекомендациями производителя.

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

- Прежде чем вводить клетки в проточный цитометр, тщательно перемешайте их в вихревой мешалке на низких оборотах, чтобы уменьшить агрегацию.²²
- 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 программного обеспечения.
- На соответствующих графиках при помощи комбинации гейтов, областей или квадрантов изолируйте целевую популяцию (рис. 1).

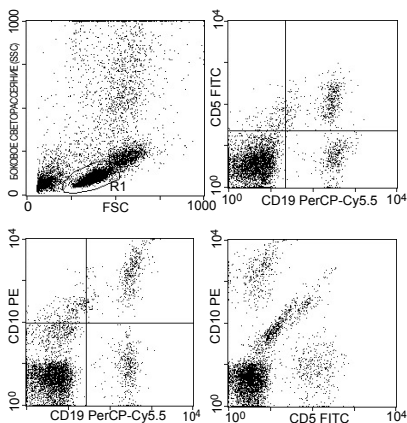


Рис. 1. Точечные диаграммы, отображающие область R1 и квадранты

- Определите экспрессию антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD5 распознает антиген Т-лимфоцита человека молекулярной массой 67 килодальтон (кДа).²³

CD10 (анти-CALLA) распознает антигенный маркер острого лимфобластного лейкоза (CALLA) молекулярной массой 100 кДа.^{5, 24} Антиген CD10 идентичен мембранно-связанной нейтральной эндопептидазе человека (NEP; EC 3.3.24.11), также известной, как энкефалиназа.²⁵

CD19 (SJ25C1) распознает антиген массой 90 кДа, присутствующий на В-лимфоцитах человека.^{17, 26}

Распределение антигена

Антиген CD5 присутствует приблизительно на 70 % лимфоцитов нормальной периферической крови и практически на всех Т-лимфоцитах тимуса и периферической крови.^{16, 27, 28} Антитела против CD5 реагируют с большинством клеток в Т-лимфотических областях селезенки и лимфатических узлов и со многими Т-клеточными лейкозами и лимфомами.^{29—31} Оно также вступает в реакцию с различным подмножеством нормальных В-лимфоцитов,⁶ случайными клетками в В-лимфотических областях селезенки и лимфатических узлов²⁹ и большинством Ig⁺ клеток В-хронического лимфобластного лейкоза (ХЛЛ).^{31, 32} Некоторые лимфомы также экспрессируют антиген CD5.^{30, 33}

Антиген CD10 обнаружен на лимфоцитах пациентов с острым В-лимфоидным лейкозом.³³ Антиген также присутствует на широком круге нормальных и неопластических типов клеток,⁹ включая нормальные гранулоциты.⁵

Антиген CD19 присутствует примерно на от 7 до 23 % лимфоцитов периферической крови человека³⁴ и на спленоцитах.³⁵ Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека практически на всех стадиях созревания.^{1, 17} CD19 не реагирует с покоящимися и активированными Т-лимфоцитами, гранулоцитами и моноцитами.^{1, 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, 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 содержания, 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 приготвление 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

- 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.
- Hoffkes HG, Schmidtke G, Uppenkamp M, Schmucker U. Multiparametric immunophenotyping of B cells in peripheral blood of healthy adults by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996;3:30-36.
- Freedman AS, Nadler LM. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991;5:871-889.
- Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997;90:2863-2892.
- Zola H. CD10 Workshop Panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:505-507.
- Gadol N, Ault KA. Phenotypic and functional characterization of human Leu-1 (CD5) B cells. *Immunol Rev*. 1986;93:23.
- Schmidt CJ, Domenico L, Ward P, Barcos MP, Stewart CC. Aberrant antigen expression detected by multiparameter three color flow cytometry in intermediate and high grade B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 1999;34:539-544.
- Cabezudo E, Carrara P, Morilla R, Matutes E. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 1999;84:413-418.
- Almasri NM, Iturraspe JA, Braylan RC. CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles. *Arch Pathol Lab Med*. 1998;122:539-544.
- Pui CH, Rivera GK, Hancock ML, et al. Clinical significance of CD10 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1993;7:35-40.
- De Rossi G, Grossi C, Foa R, et al. Immunophenotype of acute lymphoblastic leukemia cells: the experience of the Italian Cooperative Group (Gimema). *Leuk Lymphoma*. 1993;9:221-228.
- Geisler CH, Larsen JK, E HN, et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1991;78:1795-1802.
- DiGiuseppe JA, Borowitz MJ. Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol*. 1998;25:6-10.

14. Baldini L, Cro L, Cortelezzi A, et al. Immunophenotypes in "classical" B-cell chronic lymphocytic leukemia. Correlation with normal cellular counterpart and clinical findings. *Cancer*. 1990;66(8):1738-1742.
15. Spier CM, Grogan TM, Fielder K, Richter L, Rangel C. Immunophenotypes in "well-differentiated" lymphoproliferative disorders, with emphasis on small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol*. 1986;17(11):1126-1136.
16. Engleman EG, Warnke R, Fox RI, Dille J, Benike CJ, Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:1791-1795.
17. 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.
18. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
19. 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.
20. *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.
21. 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.
22. 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.
23. Knowles RW. Immunocytochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
24. Greaves MF. Monoclonal antibodies as probes for leukemic heterogeneity and hematopoietic differentiation. In: Knapp W, ed. *Leukemia Markers*. New York, NY: Academic Press; 1981:19.
25. Letarte M, Vera S, Tran R, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med*. 1988;168:1247-1253.
26. 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.
27. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
28. Ledbetter JA, Frankel AE, Herzenberg LA. Human Leu T-cell differentiation antigens: quantitative expression on normal lymphoid cells and cell lines. In: Hammerling G, Hammerling U, Kearney J, eds. *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas: Perspectives and Technical Notes*. New York, NY: Elsevier/North Holland; 1981:16-22.
29. Warnke RA, Levy R. Detection of T and B antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*. 1980;28:771-776.
30. Warnke R, Miller R, Grogan T, Pederson M, Dille J, Levy R. Immunologic phenotype in 30 patients with diffuse large-cell lymphoma. *N Eng J Med*. 1980;303:293-300.
31. Zipf RF, Fox R, Dille J, Levy R. Definition of the high risk ALL patient by immunologic phenotyping with monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1981;41:4786.
32. Royston I, Majda JA, Baird SM, Meserve BL, Griffiths JC. Human T-cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65,000-dalton antigen of T cells (T65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. *J Immunol*. 1980;125:725.
33. Le Bien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10): emancipation from a functional enigma. *Blood*. 1989;73:625-635.
34. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
35. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.