



BD Oncomark CD7 FITC/CD33 PE

Кат. № 333176

7/2010

23-13733-01



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™ CD7 FITC/CD33 PE предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro*. Этот реагент можно использовать для оценки экспрессии антигена CD7 в миелоидных линиях клеток. CD33 используется для идентификации миелоидных клеток.¹ CD7, который экспрессируется в нормальных Т-лимфоцитах и естественных киллерах, часто aberrантно экспрессируется при остром миелолейкозе (ОМЛ) и может использоваться в диагностике данного заболевания.^{2—6} Анализ с использованием CD7/CD33 применяется в диагностике гематологических заболеваний.^{1, 2, 4—7}

2. СОСТАВ

CD7, клон M-T701,⁸ получают путем гибридизации клеток миеломы мышей P3-X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных клетками P-CLL и Jurkat.

CD33, клон P67.6, получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками FMY9S5, содержащими ген CD33.

CD7 и CD33 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиноного IgG₁.

Этот реагент поставляется в виде комбинации CD7 FITC и CD33 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 смывать большим количеством воды во избежание осаждения на свинцовых или медных трубах, где возможно образование взрывоопасных условий.

Чистота антигел:

- 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 эквивалентные.
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette; BD кат. № 646539, или эквивалентные).
- 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). Может вызывать сенсibilизацию при контакте с кожей (R43). При использовании не принимать пищу и напитки (S20).

- Оснащенный соответствующим образом 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 CD7 FITC/CD33 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.^{9, 10}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{11, 12} 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.⁹

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 % с изначальным объемом.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark CD7/CD33 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 лизирующего раствора 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 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 в вортексе на малой скорости.¹³
- 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.
- На соответствующих графиках при помощи комбинации гейтов, областей или квадрантов изолируйте целевую популяцию (рис. 1).

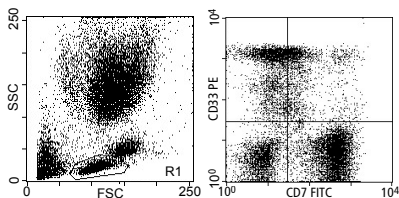


Рис. 1. Точечная диаграмма, отображающая область R1 и квадранты

- Определите экспрессию антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

CD7 распознает антиген Т-лимфоцитов и естественных киллеров человека молекулярной массой 40 килодальтон (кДа).^{14, 15}

CD33 распознает антиген человеческих миеломоноцитов молекулярной массой 67 кДа.¹⁶

Распределение антигена

Антиген CD7 на всех этапах дифференцировки Т-лимфоцитов.¹⁵ Он присутствует на 85—90 % Т-лимфоцитов периферической крови.¹⁵ У здоровых людей CD7 реагирует со всеми CD8⁺ лимфоцитами, приблизительно с 90 % CD4⁺ лимфоцитов и с большинством естественных киллеров.¹⁵ CD7 слабо реагирует с моноцитами и не реагирует с гранулоцитами¹⁴ и В-лимфоцитами.¹⁵ При лейкозах антиген CD7 присутствует на большинстве линий Т-лимфоцитов.¹⁷

Антиген CD33 присутствует на моноцитах (яркое свечение) и гранулоцитах (тусклое свечение).¹⁸ Далее, исходя из окрашивания CD33 в комбинации с другими поверхностными антигенами клеток,

гранулоциты могут подразделяться на популяции нейтрофилов, эозинофилов и базофилов.¹⁸ Антиген CD33 экспрессируется на бластных клетках в более 85 % случаев острого миелолейкоза (ОМЛ) и может быть абберантно экспрессирован при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ).¹⁹ Нормальные лимфоциты, тромбоциты и эритроциты не экспрессируют антиген CD33.²⁰

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 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 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.
	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 исправить цитометр.

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. Del Poeta G, Stasi R, Venditti A, et al. CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1995; 17(1-2):111-119.
3. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol*. 1995;70(4):189-194.
4. Kornblau SM, Thall P, Huh YO, Estey E, Andreeff M. Analysis of CD7 expression in acute myelogenous leukemia: martingale residual plots combined with "optimal" cutpoint analysis reveals absence of prognostic significance. *Leukemia*. 1995;9(10):1735-1741.
5. Tien HF, Chou CC, Wang CH, Chang CH, Hsing CC. Putative normal counterparts of leukaemic cells from CD7-positive acute myeloid leukaemia can be demonstrated in human haemopoietic tissues. *Br J Haematol*. 1996;94(3):501-506.
6. Saxena A, Sheridan DP, Card RT, McPeck AM, Mewdell CC, Skinnider LF. Biologic and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 1998;58(4):278-284.
7. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol*. 1995;70:189-194.
8. Reiter C. Cluster report: CD7. In: Knapp W, Dörken B, Gils WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:341-342.
9. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
10. 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.
11. *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.
12. 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.

13. 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.
14. Link M, Warnke R, Finlay J, et al. A single monoclonal antibody identifies T-cell lineage of childhood lymphoid malignancies. *Blood*. 1983;62:722-728.
15. Palker TJ, Searce RM, Hensley LL, Ho W, Haynes BF. Comparison of the CD7 (3A1) group of T cell workshop antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:303-313.
16. Köller U, Peschel CH. Cluster report: CD33. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:812-813.
17. Weiss LM, Crabtree GS, Rouse RV, Warnke RA. Morphologic and immunologic characterization of 50 peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol*. 1985;118:316-324.
18. Terstappen LWMM, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
19. Foon KA, Todd III RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986;68:1-31.
20. Bernstein ID, Singer JW, Andrews RG, et al. Treatment of acute myeloid leukemia cells *in vitro* with a monoclonal antibody recognizing a myeloid differentiation antigen allows normal progenitor cells to be expressed. *J Clin Invest*. 1987;79:1153-1159.