



# BD Oncomark FMC7 FITC/CD23 PE/CD19 PerCP-Cy5.5

Кат. № 331359

6/2010

23-13714-01



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™ FMC7 FITC/CD23 PE\*/CD19 PerCP-Cy5.5\* предназначен для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии *in vitro* нормальных и аномальных субпопуляций В-лимфоцитов. Реагенты обнаруживают экспрессию антигенов FMC7 и CD23 на нормальных и аномальных В-клетках.<sup>1–8</sup> Антиген FMC7 присутствует в субпопуляции нормальных В-лимфоцитов, но слабо выражен либо не поддается обнаружению при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ).<sup>4, 6, 9</sup> Антиген CD23 как правило не присутствует в лимфоме из клеток зоны мантии<sup>1, 4, 6</sup>, но может присутствовать в других В-клеточных неоплазмах, таких как В-клеточный ХЛЛ и небольшие лимфоцитарные лимфомы.<sup>1, 8</sup> Количественный анализ FMC7/CD23/CD19 используется для диагностики гематологических заболеваний.<sup>1–8</sup>

## 2. СОСТАВ

Клон FMC7<sup>10</sup> образуется при слиянии клеток миеломы мышей P3-NS1-1-AG4-1 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных В-лимфобластоидными клетками человека линии HRIK.

CD23, клон EBVCS-5,<sup>11</sup> получают путем гибридизации клеток миеломы мышей Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных *in vitro*-трансформированными клетками линии EBV.

CD19, клон SJ25C1,<sup>12</sup> получают путем гибридизации мышиных клеток Sp2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками NALM1 + NALM16.

\* 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.

FMC7 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgM. CD23 и CD19 состоят из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG<sub>1</sub>.

Этот реагент поставляется в виде комбинации FMC7 FITC, CD23 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: ≤ 20 % свободного флуорофора на момент упаковки по результатам измерения методом экслюзионной 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 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

---

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

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 FMC7 FITC/CD23 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.<sup>13, 14</sup>

**ОСТОРОЖНО!** Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником

инфицирования<sup>15, 16</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 оценивать жизнеспособность образцов и установить пороговое значение. Рекомендуется пороговое значение не менее 80 % жизнеспособных клеток.<sup>13</sup>

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 центрифугированием и ресуспендируйте в однократном PBS с 0,1 % азида до первоначального объема.

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Oncomark FMC7/CD23/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.

- 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.<sup>17</sup>
- 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).

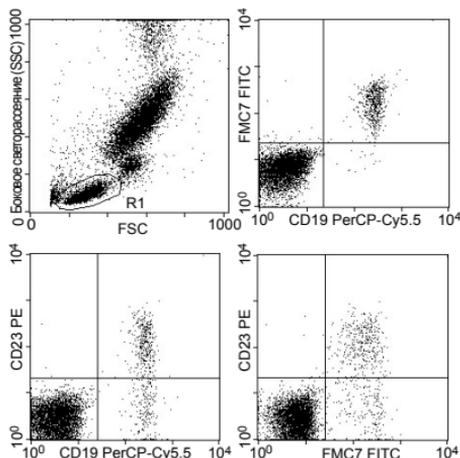


Рис. 1. Точечные диаграммы, отображающие область R1 и квадранты

- Определите экспрессию антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

## 7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Специфичность

FMC7 распознает экспрессию мембранного гликопротеина молекулярной массой 105 килодальтон (кДа) на субпопуляции В-лимфоцитов.<sup>10</sup>

CD23 распознает дифференцировочный антиген В-лимфоцита человека молекулярной массой 45 кДа, низкоаффинный рецептор Fc epsilon.<sup>18–21</sup>

CD19 (SJ25C1) распознает антиген массой 90 кДа, присутствующий на В-лимфоцитах человека.<sup>12, 22</sup>

### Распределение антигена

Более 50 % периферических В-лимфоцитов здоровых взрослых людей

несут антиген FMC7 переменной плотности. FMC7 положительные В-клетки более зрелые. Они являются субпопуляциями, отвечающими митогенам или антигенам *in vitro*.<sup>10, 23</sup> Антиген FMC7 обнаружен на В-клеточных злокачественных новообразованиях на большинстве стадий развития, таких как лимфома из клеток зоны мантии (ЛКМ), фолликулярная лимфома и злокачественный ретикулоэндотелиоз, но не в большинстве случаев это ХЛЛ.<sup>3, 6, 24—26</sup>

Антиген CD23 в малой плотности присутствует на большинстве нормальных В-лимфоцитах<sup>27</sup> и на более высоких уровнях активированных В-лимфоцитов, EBV-трансформированных лимфобластах, клетках ХЛЛ В-лимфоцитарного происхождения и тонзиллярных В-лимфоцитах.<sup>21</sup>

Плотность антигена CD23 увеличивается на поверхности В-лимфоцитов сразу после их активации.<sup>28</sup> Антиген исчезает после перехода изотипа на IgA, IgG или IgE.<sup>20, 27</sup> Антиген CD23 не присутствует на незрелых В-лимфоцитах костного мозга или на Т-лимфоцитах,<sup>20</sup> но он обнаружен на моноцитах, гиподенсивных эозинофилах и субпопуляции тромбоцитов.<sup>29</sup>

Антиген CD19 присутствует примерно на от 7 до 23 % лимфоцитов периферической крови человека<sup>30</sup> и на спленоцитах.<sup>31</sup> Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека на практически всех стадиях созревания.<sup>12, 32</sup> CD19 не реагирует с покоящимися и активированными Т-лимфоцитами, гранулоцитами и моноцитами.<sup>12, 32</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. 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 Opsona<sup>®</sup> 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 содержимого, 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 дегресса 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	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

1. Tworek JA, Singleton TP, Schnitzer B, Hsi ED, Ross CW. Flow cytometric and immunohistochemical analysis of small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma, and plasmacytoid small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1998;110:582-589.
2. Hoffkes HG, Schmidke 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.
3. Huh YO, Pugh WC, Kanjarjian HM, et al. Detection of subgroups of chronic B-cell leukemias by FMC7 monoclonal antibody. *Am J Clin Pathol*. 1994;101:283-289.
4. DiGiuseppe JA, Borowitz MJ. Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol*. 1998;25:6-10.
5. Hübl W, Iturraspe J, Braylan RC. FMC7 antigen expression on normal and malignant B-cells can be predicted by expression of CD20. *Cytometry*. 1998;34:71-74.
6. Kilo MN, Dorfman DM. The utility of flow cytometric immunophenotypic analysis in the distinction of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1996;105:451-457.
7. 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.
8. Marti GE, Zenger V, Caproaso NE, et al. Antigenic expression of B-cell chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Anal Quant Cytol Histol*. 1989;11:315-323.
9. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-1645.
10. Brooks DA, Beckman IGR, Bradley J, McNamara PJ, Thomas ME, Zola H. Human lymphocyte markers defined by antibodies derived from somatic cell hybrids. IV. A monoclonal antibody reacting specifically with a subpopulation of human B lymphocytes. *J Immunol*. 1981;126:1373-1377.
11. Kintner C, Sugden B. Identification of antigenic determinants unique to the surfaces of cells transformed by Epstein-Barr Virus. *Nature*. 1981;294:458-460.
12. 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.
13. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
14. 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.
15. *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.
16. 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.
17. 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.
18. Nadler LM. Cluster report: CD23. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:25-26.
19. Gordon J, Webb A, Walker L, Guy G, Rowe M. Evidence of an association between CD23 and the receptor for a low molecular weight B-cell growth factor. *Eur J Immunol*. 1986;16:1627.
20. Yukawa K, Kikutani H, Owaki H, et al. A B-cell-specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (Fc  $\epsilon$  R) on lymphocytes. *J Immunol*. 1987;138:2576-2580.
21. Thorley-Lawson D, Nadler L, Bhan A, Schooley R. Blast-2 (EBVCS), an early cell surface marker of human B cell activation, is superinduced by Epstein Barr Virus. *J Immunol*. 1985;134:3007-3012.
22. 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.
23. Bloem AC, Chand MA, Dollekamp I, Rijkers GT. Functional properties of human B cell subpopulations defined by monoclonal antibodies HB4 and FMC7. *J Immunol*. 1988;140:768-773.
24. Hassan IB, Hagberg H, Sundström C. Immunophenotype of hairy-cell leukemia. *Eur J Haematol*. 1990;45:172-176.

25. Zola H, Neoh SH, Potter A, Melo JV, De Oliveria MSP, Catovsky D. Markers of differentiated B cell leukaemia: CD22 antibodies and FMC7 react with different molecules. *Disease Markers*. 1987;5:227-235.
26. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 1994;14:57-61.
27. Kikutani H, Inui S, Sato R, et al. Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell*. 1986;47:657-665.
28. Gordon J, Rowe M, Walker L, Guy G. Ligation of the CD23,p45 (Blast-2, EBVCS) antigen triggers the cell-cycle progression of activated B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1986;16:1075-1080.
29. Capron M, Jouault T, Prin L, et al. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (FcεR2) of eosinophils, platelets, and macrophages. *J Exp Med*. 1986;164:72-89.
30. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
31. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
32. 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.