



BD Simultest Anti-Kappa F(ab')₂ FITC/CD19 PE

Кат. № 333186

7/2010

23-13773-02



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

BD Simultest™ Anti-Kappa F(ab')₂ FITC/CD19 PE предназначен для иммунофенотипирования лейкоцитов периферической крови методом проточной цитометрии *in vitro*. Количественные анализы с использованием Anti-Kappa F(ab')₂/CD19 применяются в диагностике гематологических заболеваний.^{1, 2}

2. СОСТАВ

Anti-Kappa F(ab')₂ получают из смешанной антисыворотки, полученной от гипериммунизированных коз и очищенной методом аффинной хроматографии. Предоставляется в виде фрагментов F(ab')₂.

CD19, клон SJ25C1,³ получают путем гибридизации мышиных клеток SP2/0 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных клетками NALM1 + NALM16.

Anti-Kappa F(ab')₂ состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁. CD19 состоит из тяжелых цепей и легких каппа-цепей мышиного IgG₁.

Этот реагент поставляется в виде комбинации Anti-Kappa F(ab')₂ FITC и CD19 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 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 эквивалентные.
- Дозатор с наконечниками (электронная пипетка BD Electronic Pipette, BD кат. № 646539, или эквивалентные).
- Вихревая мешалка «вортекс».
- Лизирующий раствор BD FACST™ 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 Simultest Anti-Kappa F(ab')₂ FITC/CD19 PE может использоваться для иммунофенотипирования клеток в образцах периферической крови и аспиратах костного мозга, собранных в EDTA (например, в пробирки BD Vacutainer™), методом проточной цитометрии. Различные типы образцов имеют разные требования к условиям хранения и ограничения, которые необходимо учесть перед забором и анализом.^{4, 5}

ОСТОРОЖНО! Все биологические образцы и контактирующие с ними материалы рассматриваются как биологически опасные. Они подлежат обращению как с потенциальным источником инфицирования^{6, 7} 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.⁴

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

1. Добавьте 20 мкл реагента BD Simultest Anti-Kappa F(ab')₂/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.
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.

- Для уменьшения агрегации перед запуском в проточный цитометр тщательно перемешайте клетки на вортексе на малой скорости.⁸
- Загрузите образец в проточный цитометр.

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

- Получите 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).

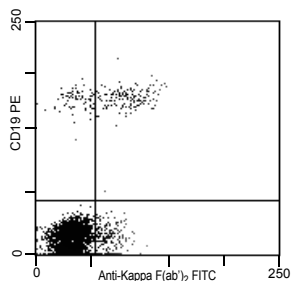


Рис. 1 Анализ методом двухцветной флуоресценции

- Определите экспрессию антигена, основываясь на отрицательной популяции образца.

7. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Anti-Kappa F(ab')₂ вступает в реакцию с легкими каппа-цепями иммуноглобулина человека.

CD19 (SJ25C1) распознает антиген массой 90 килодальтон (кДа), присутствующий на человеческих В-лимфоцитах.^{3, 9}

Распределение антигена

Иммуноглобулины, содержащие легкие каппа-цепи, присутствуют примерно на 50 % нормальных В-лимфоцитов^{10—13} и на Ig-κ лейкозных лимфоидных клетках.^{10—18} В сыворотке Anti-Kappa F(ab')₂ вступает в реакцию как с иммуноглобулинами, содержащими легкие каппа-цепи, так и со свободными легкими каппа-цепями.

Антиген CD19 присутствует примерно на 7—23 % лимфоцитов периферической крови человека¹⁹ и на спленоцитах.²⁰ Антиген CD19 присутствует на В-лимфоцитах человека практически на всех стадиях созревания.^{3, 21} CD19 не реагирует с покоящимися и активированными Т-лимфоцитами, гранулоцитами и моноцитами.^{3, 21}

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 Simultest 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.
	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 устранить неисправность прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bain B, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly J. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haem.* 2002;24:1-13.
2. Communications in Clinical Cytometry. *Cytometry.* 2001;46:23-27.
3. 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.

4. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 1996;10:877-895.
5. Stelzel 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.
6. *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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Ault KA. Flow cytometric evaluation of normal and neoplastic B cells. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:247-253.
11. Weinberg DS, Pinkus GS, Ault KA. Cytofluorometric detection of B cell clonal excess: a new approach to the diagnosis of B cell lymphoma. *Blood*. 1984;63:1080-1087.
12. Têtu B, Manning JT, Ordóñez NG. Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies directed against immunoglobulin light and heavy chains in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1985;85:25-31.
13. Harris NL, Data RE. The distribution of neoplastic and normal B-lymphoid cells in nodular lymphomas: use of an immunoperoxidase technique on frozen sections. *Human Pathol*. 1982;13:610-617.
14. Meis J, Osborne B, Butler J. A comparative marker study of large cell lymphoma, Hodgkin's disease, and true histiocytic lymphoma in paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol*. 1986;86:591-599.
15. Picker LJ, Weiss LM, Medeiros LJ, Wood GS, Warnke RA. Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*. 1987;128:181-201.
16. Foon KA, Todd III RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986;68:1-31.
17. Tubbs RR, Sheibani K, Weiss RA, Sebek BA, Deodhar SD. Tissue immunomicroscopic evaluation of monoclonality of B-cell lymphomas: comparison with cell suspension studies. *Am J Clin Pathol*. 1981;76:24-28.
18. Smith B, Weinberg D, Robert N, et al. Circulating monoclonal B lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1984;311:1476-1481.
19. Reichert T, DeBruyère M, Deney V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
20. Tedder T, Zhou L-J, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
21. 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.