

Polyclonal Rabbit Anti-Human IgD/FITC, Rabbit F(ab')₂
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgD/RPE, Rabbit F(ab')₂

Nr kat. F0189
Nr kat. R5112

Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych *in vitro*.

Produkty o nr kat. F0189 i R5112 są przeznaczone do użytku w cytometrii przepływowej. W cytometrii przepływowej przeciwciała dla IgD są przydatne w wykrywaniu obecności powierzchniowych IgD i, co za tym idzie, w szczegółowej klasyfikacji zaburzeń limfoproliferacyjnych komórek B, wraz z panelem innych przeciwciał (1–6). Interpretację wyników powinien przeprowadzić pracownik uprawniony do wykonywania takich badań, na podstawie historii choroby pacjenta oraz innych testów diagnostycznych.

Wstęp

Większość komórek B, poza komórkami prekursorowymi pre-B i komórkami pre-B, jak również dojrzałych komórek plazmatycznych, wykazuje ekspresję immunoglobuliny na powierzchni komórki. Komórki pre-B wykazują ekspresję cytoplazmatycznych łańcuchów μ bez ekspresji łańcuchów lekkich, natomiast w niedojrzałych limfocytach B występuje wyłącznie ekspresja błonowej IgM. Dojrzewające limfocyty B dodatkowo wytwarzają IgD, która dołącza do występującej w błonie komórkowej IgM, tworząc populację limfocytów B typu IgM+IgD+. Populacja ta stanowi najliczniejszą grupę krążących limfocytów B u człowieka. Późniejsze przegrupowanie stałego regionu genów kodujących ciężkie łańcuchy immunoglobulin wywołuje w komórkach ekspresję powierzchniowej IgG lub IgA, początkowo razem z IgM lub IgD. Odsłonięcie antygeny aktywuje produkcję tych komórek. Mogą one powstawać z mniej dojrzałych prekursorów limfocytów B podczas pierwotnej odpowiedzi immunologicznej lub z komórek pamięci podczas odpowiedzi wtórnej (7). Komórki przewlekłej białaczki limfatycznej typu B (B-CLL) cechują się zwykle obecnością zarówno powierzchniowych IgM, jak i IgD (2–6). Ponadto komórki IgM- i IgD-dodatnie obserwuje się często w przypadku białaczki prolimfatycznej typu B, białaczki włochatokomórkowej, chłoniaka limfocytowego kosmatokomórkowego śledziony, chłoniaka strefy płaszczu i chłoniaka z grudek chłonnych (1, 5).

Odczynnik dostarczony

Koniugaty przeciwciał dla IgD o nr kat. F0189 i R5112 zostały wyprodukowane z fragmentu F(ab')₂ króliczego przeciwciała poliklonalnego, wyizolowanego na drodze chromatografii powinowactwa. Koniugaty są dostarczane w postaci płynnej w buforze zawierającym 1% albuminę surowicy bydlęcej (BSA) oraz 15 mmol/L Na₂SO₄ o pH 7,2. Każda fiołka zawiera 100 testów (10 μ L koniugatu przeznaczone jest dla maksymalnie 10⁶ leukocytów z normalnej ludzkiej krwi obwodowej).

Stężenie koniugatu g/L: patrz informacja podana na etykiecie fiołki.

Przeciwciało nr kat.	Fluorochrom	Kontrola ujemna nr kat.
F0189	FITC (izomer 1 izotiocyanianu fluoresceiny)	X0929
R5112	RPE (R-fikoerytryna)	X0930

Przygotowanie

1. Przeciwciało użyte do skoniugowania z FITC i RPE zostało poddane absorpcji w fazie stałej z użyciem białek osocza ludzkiego, w celu usunięcia niepożądanych przeciwciał.
2. Zaabsorbowane przeciwciało poddano dalszemu oczyszczaniu drogą chromatografii powinowactwa na kolumnie z ludzkim IgD.
3. Przeciwciało wyizolowane drogą powinowactwa zostało następnie poddane degradacji z użyciem pepsyny i fragmentu F(ab')₂ wyizolowanego przez filtrację żelową.
4. Na koniec fragment F(ab')₂ został skoniugowany z izomerem 1 izotiocyanianu fluoresceiny (FITC) lub R-fikoerytryną.

Immunogen

IgD wyizolowane z puli surowicy ludzkiej.

Swoistość

Przeciwciało dla IgD reaguje z łańcuchami δ ludzkiej IgD. Swoistość stwierdzono poniższymi metodami. Aby uzyskać maksymalną czułość, przed oczyszczaniem drogą powinowactwa i degradacją pepsyną wykonano test swoistości metodą immunoelektroforezy krzyżowej i ELISA.

Immunoelektroforeza krzyżowa: Łuk precipitacyjny IgD pojawia się wyłącznie w testach przeprowadzanych na osoczu ludzkim. Barwienie: barwnik Coomassie Brilliant Blue.

ELISA: W pośrednim teście ELISA nie obserwuje się znaczących reakcji z ludzką IgG, IgA, IgM lub surowicą pozbawioną IgD.

Cytometria przepływowa: W testach na lizacie pełnej krwi ludzkiej przeciwciało dla IgD znakuje podgrupę komórek CD19-dodatnich.

Przepływowa analiza cytometryczna limfocytów krwi obwodowej wskazuje, że przeciwciało znakuje znaczną część komórek B-CLL. Dlatego też w analizie obejmującej 121 przypadków (3) 1 oznaczono jako wyłącznie IgD-dodatnie, natomiast w pozostałych 21 przypadkach stwierdzono obecność zarówno IgD, jak i IgM. W innym badaniu obejmującym 165 przypadków (4), 117 oznaczono jako IgD-dodatnie, chociaż w wielu z nich stwierdzono również obecność IgM.

Środki ostrożności

1. Do stosowania przez wyszkolony personel.
2. Produkt zawiera azydek sodu (Na₂S), substancję chemiczną silnie toksyczną w czystej postaci. Azydek sodu, zastosowany w produkcie w stężeniu, które nie jest sklasyfikowane jako niebezpieczne, może reagować z elementami kanalizacji wykonanymi z ołowiu i miedzi, powodując nagromadzenie silnie wybuchowych azydów metali. Po usunięciu spłukać dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu się azydku metalu w kanalizacji.
3. Podobnie jak w przypadku wszelkich materiałów pochodzących ze źródeł biologicznych, należy stosować właściwe procedury postępowania.
4. W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne.
5. Niewykorzystany roztwór utylizować zgodnie z lokalnymi, wojewódzkimi i krajowymi rozporządzeniami.

Przechowywanie

Przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze 2–8°C. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie fiołki. Jeśli odczynnik jest przechowywany w warunkach innych niż podane powyżej, użytkownik musi zweryfikować takie warunki. Nie ma oczywistych oznak wskazujących na utratę stabilności produktu. Dlatego jednocześnie z badaniem próbek pacjenta należy wykonywać kontrole dodatnie i ujemne. W trakcie przechowywania może wytrącić się niewielki osad, powodując nieswoiste barwienie z utworzeniem drobnych granulek. Początkową wysoką jakością koniugatu można przywrócić przez odfiltrowanie (filtr z octanu celulozy 0,22 µm). Nie przechowywać rozcieńczonych koniugatów. W wypadku nieoczekiwanego wyniku odczynu, którego nie można wyjaśnić różnicami w procedurach laboratoryjnych, gdy podejrzewa się problem z przeciwciałem, należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy Dako.

Uwagi dotyczące procedury

Przed rozpoczęciem barwienia próbek krwi obwodowej, komórki jednojądrzaste należy wyizolować przez odwirowanie na podłożu rozdzielającym bądź przepłukanie próbki w celu usunięcia rozpuszczalnych białek surowicy. Ponieważ ludzkie monocyty wiążą immunoglobuliny surowicy przez receptory powierzchniowe Fc, komórki te należy usunąć lub zidentyfikować.

Procedura barwienia










1. Pobrać krew żylną do próbówki z antykoagulantem.
2. Przenieść do próbówki 100 µL krwi z antykoagulantem.
3. Dodać 2 mL 0,01 mol/L PBS o pH 7,4. Delikatnie wymieszać w wytrząsarce.
4. Wirować przy 300 × g przez 5 minut, następnie zassać supernatant, pozostawiając około 50 µL płynu.
5. Powtórzyć jeszcze dwa razy etapy 3 i 4.
6. Dodać 10 µL frakcji immunoglobulin króliczych, nr kat. X0903, w celu zablokowania reakcji. Delikatnie wymieszać w wytrząsarce; inkubować w ciemności w temperaturze 37°C przez 30 minut.
7. Dodać 10 µL fluorochromu skoniugowanego z przeciwciałem dla IgD. Delikatnie wymieszać.
8. Jako kontrolę ujemną zastosować niereaktywny fragment F(ab')₂ immunoglobuliny króliczej skoniugowany z tym samym fluorochromem (zob. tabela).
9. Inkubować w ciemności w temperaturze 4°C przez 30 minut.
10. Do każdej próbówki dodać 1–2 mL czynnika hemolizującego erytrocyty; delikatnie wymieszać. Odnośnie do czasu i temperatury inkubacji postępować według zaleceń producenta.
11. Wirować przy 300 × g przez 5 minut.
12. Zassać supernatant, pozostawiając około 50 µL płynu.
13. Dodać 2 mL 0,01 mol/L PBS o pH 7,4. Delikatnie wymieszać w wytrząsarce.
14. Powtórzyć etapy 11 i 12.
15. Ponownie przygotować granulkę w zawiesinie, w płynie odpowiednim dla analizy cytometrycznej, np. w 0,3 mL 1% paraformaldehydu (utrwalacz) w 0,01 mol/L PBS o pH 7,4.
16. Analizować na cytometrze przepływowym.

Dla zapewnienia kontroli odczynników i przygotowania próbek zalecane jest stosowanie podczas każdego testu odpowiednich próbek kontroli dodatniej i ujemnej. Należy pamiętać, że koniugaty fluorochromu są wrażliwe na działanie światła, dlatego podczas procedury barwienia i do chwili wykonania analizy należy chronić próbki przed działaniem światła.

Piśmiennictwo

1. van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukaemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editors. Leukemia. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company; 1996. p. 83–130.
2. Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE, Hansen MM, Christensen BE, Lund B et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 1991; 78:1795–1802.
3. Cartron G, Linassier C, Bremond JL, Desablens B, Georget MT, Fimbel B et al. CD5 negative B-cell chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological features of 42 cases. Leuk Lymphoma 1998; 31:209–16.
4. Gandini D, Lanza F, Latorraca A, Levato F, Del Senno L, Castoldi G. Immunophenotypic and genotypic characterization of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients from Northern Italy. Haematologica 1993; 78:18–24.
5. Batata A, Shen B. Immunophenotyping of subtypes of B-chronic (mature) lymphoid leukemia. A study of 242 cases. Cancer 1992; 70:2436–43.
6. Shen PUF, Fuller SG, Rezuke WN, Sherburne BJ, DiGiuseppe JA. Laboratory, morphologic, and immunophenotypic correlates of surface immunoglobulin heavy chain isotype expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Am J Clin Pathol 2001; 116:905–12.
7. Deegan MJ. B lymphocytes and plasma cells: their development and identification. In: Keren DF, editor. Flow cytometry in clinical diagnosis. Chicago: ASCP Press; 1989. p. 139–63.

Objaśnienia symboli

 REF	Numer katalogowy	 2°C–8°C	Ograniczenie temperatury		Zużyć przed
 IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Chronić przed światłem słonecznym (patrz część dotycząca przechowywania)		Producent
	Sprawdzić w instrukcji obsługi	 LOT	Numer partii	 EC REP	Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com