

**Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/FITC, Rabbit F(ab')<sub>2</sub>**  
**Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/RPE, Rabbit F(ab')<sub>2</sub>**

**F0058**  
**R5111**

**Przeznaczenie**

Do badań diagnostycznych in vitro.

Odczynniki F0058 i R5111 są przeznaczone do użytku w cytometrii przepływowej. W cytometrii przepływowej przeciwciała przeciwko IgM są przydatne w wykrywaniu IgM na powierzchni komórek, a w związku z tym określaniu podtypu ostrych białaczek limfoblastycznych podtypu pre-B (białaczki ALL podtypu pre-B), ostrych białaczek limfoblastycznych B-komórkowych (B-ALL) oraz przewlekłych B-komórkowych chorobach limfoproliferacyjnych wraz z panelem innych przeciwciał (1–6). Interpretacja wyników musi zostać przeprowadzona przez certyfikowanego specjalistę z uwzględnieniem historii choroby pacjenta i wyników innych badań diagnostycznych.

**Streszczenie i wyjaśnienie**

Większość limfocytów B, za wyjątkiem komórek progenitorowych limfocytów pre-B i limfocytów pre-B i dojrzałych komórek osocza wykazuje ekspresję immunoglobuliny na swojej powierzchni. Limfocyty pre-B wykazują ekspresję cytoplazmatyczną łańcuchów  $\mu$ , ale nie łańcuchów lekkich, podczas gdy niedojrzałe limfocyty B wykazują ekspresję przeciwciał IgM wyłącznie w błonie komórkowej. Dojrzwiałe limfocyty B wytwarzają dodatkowo przeciwciała IgD, które zostaje wprowadzone do błony komórkowej, łącząc się z IgM i tworząc populację limfocytów B IgM+IgD+, będącą największą populacją limfocytów B krążących w organizmie człowieka. Późniejsza rearanżacja regionu stałego genów ciężkiego łańcucha immunoglobuliny powoduje ekspresję IgG lub IgA na błonie komórek, początkowo razem z przeciwciałami IgM i IgD. Wytwarzanie tych komórek jest aktywowane przez ekspozycję na antygen. Mogą one rozwijać się z mniej dojrzałych prekursorów limfocytów B w odpowiedzi pierwotnej lub z komórek pamięci w odpowiedzi wtórnej (7). Komórki przewlekłej B-komórkowej białaczki limfocytowej (B-CLL) wykazują zazwyczaj powierzchniową ekspresję przeciwciał IgM i IgD (2–6). Co więcej, ekspresja przeciwciał IgM i IgD często występuje w przypadkach proliferyatywnej białaczki B-komórkowej, białaczki włochatokomórkowej, chłoniaka śledziony z kosmkowymi limfocytami, chłoniaka z komórek płaszczka i chłoniaka grudkowego (1, 5). Przypadki białaczki ALL podtypu pre-B wykazują cytoplazmatyczną ekspresję przeciwciał IgM, podczas gdy w białaczce ALL B-komórkowej wykazywana jest powierzchniowa ekspresja przeciwciał (1).

**Dostarczony odczynnik**

Koniugaty przeciwko IgM, F0058 i R5111, zostały uzyskane z izolowanego przez powinowactwo fragmentu F(ab')<sub>2</sub> króliczego przeciwciała poliklonalnego. Koniugaty są dostarczane w postaci ciekłej w buforze zawierającym albuminę surowicy bydlęcej (BSA) w stężeniu 1% oraz 15 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2. Każda fiołka z F0058 zawiera 100 testów (10  $\mu$ L F0058 dla nawet 10<sup>6</sup> leukocytów z prawidłowej ludzkiej krwi obwodowej). Każda fiołka z R5111 zawiera 100 testów (10  $\mu$ L koniugatu dla nawet 10<sup>6</sup> leukocytów z prawidłowej ludzkiej krwi obwodowej).

Stężenie koniugatu w g/L: patrz etykieta na fiołce.

Nr kat. przeciwciała	Fluorochrom	Nr kat. kontroli ujemnej
F0058	FITC (izotiocyanian fluoresceiny – izomer 1)	X0929
R5111	RPE (R-fikoerytryna)	X0930

**Przygotowanie**

1. Przeciwciała wykorzystane do skoniugowania z FITC i RPE poddano absorpcji w fazie stałej z białkami surowicy ludzkiej i bydlęcej w celu usunięcia niechcianych przeciwciał.
2. Zaabsorbowane przeciwciała zostało następnie oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa na kolumnie z immobilizowanymi ludzkimi przeciwciałami IgM.
3. Wyizolowane przez powinowactwo przeciwciała zostało następnie poddane trawieniu pepsyną, a fragmenty F(ab')<sub>2</sub> zostały wyizolowane z zastosowaniem filtracji żelowej.
4. Na koniec, fragment F(ab')<sub>2</sub> został skoniugowany z izomerem 1 izotiocyanianu fluoresceiny lub R-fikoerytryną.

**Immunogen**

Immunoglobulina IgM wyizolowana z ludzkiej surowicy pacjentów z makroglobulinemią Waldenströma.

**Swoistość**

Przeciwciała przeciwko IgM reaguje z łańcuchami ludzkich IgM typu  $\mu$ . Jego określono w sposób opisany poniżej. W celu uzyskania maksymalnej czułości, przed oczyszczaniem metodą powinowactwa i degradacją pepsyną wykonano testy swoistości metodą immunoelektroforezy krzyżowej i testem ELISA.

Immunoelektroforeza krzyżowa: w testach przeciwciała na osoczu ludzkim pojawia się wyłącznie łuk precypitacyjny IgM. Barwienie: błękit Coomassie Brilliant Blue.

Test ELISA: w pośrednich testach ELISA nie zaobserwowano żadnych istotnych reakcji z ludzkimi IgA i IgG. W testach metodą sandwich ELISA nie obserwuje się istotnych reakcji z ludzkim osoczem pozbawionym IgM.

Cytometria przepływowa: podczas testów na lizowanej pełnej krwi ludzkiej przeciwciała przeciwko IgA znakowało subpopulację komórek wykazujących ekspresję antygenu CD19.










Analiza cytometryczna limfocytów krwi obwodowej wykazała, że przeciwciała przeciwko IgM znakuje część białaczek B-CLL. W związku z tym w jednym badaniu, obejmującym 121 przypadków (3), w 32 przypadkach wykazana została ekspresja wyłącznie IgM, a w dodatkowych 21 przypadkach została wykazana ekspresja zarówno IgD, jak i IgM. W innym badaniu, obejmującym 165 przypadków (4), w 142 przypadkach wykazana została ekspresja przeciwciał IgM, przy czym w części przypadków została wykazana również ekspresja IgD.

<b>Środki ostrożności</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Do stosowania przez wyszkolony personel.</li> <li>2. Opisywany produkt zawiera silnie toksyczny związek — azyd sodu (<math>\text{NaN}_3</math>), w czystej postaci. Azyd 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 azydu metalu w kanalizacji.</li> <li>3. Podobnie jak w przypadku wszelkich materiałów pochodzących ze źródeł biologicznych, należy stosować właściwe procedury postępowania.</li> <li>4. W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne.</li> <li>5. Niewykorzystany roztwór usuwać zgodnie z rozporządzeniami lokalnymi, wojewódzkimi i krajowymi.</li> </ol>
<b>Przechowywanie</b>	<p>Przechowywać w zaciemnionym miejscu w temperaturze 2–8°C. Nie należy używać odczynników po upływie terminu ważności podanego na fiole. Jeśli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane powyżej, użytkownik powinien zweryfikować te warunki. Nie ma wyraźnych oznak wskazujących na niestabilność produktu. Dlatego jednocześnie z badaniem próbek pochodzących od pacjenta należy wykonywać kontrole dodatnie i ujemne. Podczas przechowywania od czasu do czasu może się wytworzyć niewielka ilość osadu, powodująca występowanie drobnoziarnistego, nieswoistego odczynu. Pierwotną wysoką jakość koniugatu można przywrócić poprzez wykonanie prostej filtracji (filtr z octanu celulozy 0,22 <math>\mu\text{m}</math>). Koniugatów nie należy przechowywać w formie rozcieńczonej. W przypadku uzyskania nieoczekiwanego wyniku odczynu, którego nie można wyjaśnić różnicami w procedurach laboratoryjnych, i gdy podejrzewa się problem z przeciwciałem, należy skontaktować się z naszym działem wsparcia technicznego.</p>
<b>Uwagi dotyczące procedury</b>	<p>Przed rozpoczęciem barwienia próbek krwi obwodowej komórki jednójdrzaste należy wyizolować przez odwirowanie na podłożu rozdzielającym bądź przepłukanie próbki krwi w celu usunięcia rozpuszczalnych białek surowicy. Ponieważ ludzkie monocyty wiążą immunoglobuliny surowicy przez receptory powierzchniowe Fc, komórki te należy usunąć lub zidentyfikować.</p>
<b>Procedura barwienia</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pobrać krew żylną do próbki zawierającej antykoagulant.</li> <li>2. Przenieść do próbki 100 <math>\mu\text{L}</math> krwi z antykoagulantem.</li> <li>3. Dodać 2 mL 0,01 mol/L PBS o pH 7,4. Delikatnie wymieszać na worteksie.</li> <li>4. Wirować z przyspieszeniem 300 x g przez 5 minut, a następnie pobrać supernatant, pozostawiając ok. 50 <math>\mu\text{L}</math> płynu.</li> <li>5. Powtórzyć kroki 3 i 4 jeszcze dwa razy.</li> <li>6. Dodać 10 <math>\mu\text{L}</math> frakcji immunoglobuliny króliczej, nr kat. X0903, w celu zablokowania reakcji. Delikatnie wymieszać na worteksie i inkubować w zaciemnionym miejscu, w temperaturze 37°C przez 30 minut.</li> <li>7. Dodać 10 <math>\mu\text{L}</math> przeciwciała przeciwko IgM skoniugowanego z fluorochromem. Ostrożnie wymieszać.</li> <li>8. Użyć niereaktywnego fragmentu <math>\text{F(ab')}_2</math> immunoglobulin króliczych i skoniugowanego z takim samym fluorochromem jako kontrolę ujemną (patrz tabela).</li> <li>9. Inkubować w zaciemnionym miejscu, w temperaturze 4°C przez 30 minut.</li> <li>10. Dodać 1–2 mL odczynnika lizującego erytrocyty do każdej próbki i ostrożnie wymieszać. Postępować zgodnie z zaleceniami producenta odczynnika odnośnie czasu i temperatury inkubacji.</li> <li>11. Wirować z przyspieszeniem 300 x g przez 5 minut.</li> <li>12. Pobrać supernatant, zostawiając ok. 50 <math>\mu\text{L}</math> płynu.</li> <li>13. Dodać 2 mL 0,01 mol/L PBS o pH 7,4. Delikatnie wymieszać na worteksie.</li> <li>14. Powtórzyć kroki 11 i 12.</li> <li>15. Ponownie utworzyć zawiesinę osadu w odpowiednim płynie do cytometrii przepływowej, np. 0,3 mL paraformaldehydu w stężeniu 1% (utrwalacz) w 0,01 mol/L PBS, pH 7,4.</li> <li>16. Wykonać analizę na cytometrze przepływowym.</li> </ol> <p>Zaleca się wykonanie odpowiedniej próbki kontroli dodatniej i ujemnej do każdego zadania dla kontroli odczynnika i kontroli przygotowawczej. Należy pamiętać, że koniugaty fluorochromu są wrażliwe na światło i w związku z tym próbki należy przed nim chronić podczas procesu barwienia i do momentu analizy. Do barwienia cytoplazmatycznych przeciwciał IgM zalecany jest zestaw Dako IntraStain, Fixation and Permeabilisation Kit, nr kat. K2311.</p>

## 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, Rezuze 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

	Numer katalogowy	 2°C - 8°C	Ograniczenie temperatury		Zużyć przed
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Chronić przed światłem słonecznym (patrz część dotycząca przechowywania)		Producent
	Sprawdzić w instrukcji obsługi		Numer partii		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](http://www.agilent.com)

Wersja 11.2020