

Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains/APC, Rabbit F(ab')₂
Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains/FITC, Rabbit F(ab')₂
Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains/RPE, Rabbit F(ab')₂

Code C0222
Code F0434
Code R0436

ENGLISH

Intended use
 For in vitro diagnostic use.

C0222, F0434 and R0436 are intended for use in flow cytometry. In flow cytometry, antibodies to kappa light chains are useful for the demonstration of cell surface kappa light chains, and, thus, for the identification of monoclonality (clonal excess) in B-cell lymphoproliferative disorders together with a panel of other antibodies (1-4). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

Introduction
 Most B cells, with the exception of pre-B progenitors and pre-B cells, and mature plasma cells, express immunoglobulin on their surface. Each cell expresses only one light chain type. In normal peripheral blood and lymph nodes, there is a mixture of kappa-positive and lambda-positive cells, with two-thirds of the cells expressing kappa and one-third expressing lambda (5). Since lymphoid neoplasms are usually clonal expansions of a single cell, malignant cells uniformly express the same light chain isotype. Neoplastic B-cell lymphoproliferative disorders can frequently be suspected on the basis of the demonstration of a marked predominance of cells expressing a single light chain type (4). Rare cases of kappa-negative or lambda-negative B-cell non-Hodgkin's lymphoma have been described (4, 6).

Reagent provided
 The Anti-Kappa Light Chains conjugates, C0222, F0434 and R0436, have been produced from a F(ab')₂ fragment of affinity-isolated polyclonal rabbit antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaH₃, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).

Conjugate concentration q/L: See label on vial.

Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.
C0222	APC (Allophycocyanin)	X0998
F0434	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X0929
R0436	RPE (R-Phycoerythrin)	X0930

- Preparation**
- The antibody used for APC, FITC and RPE conjugation has been solid-phase absorbed with human plasma proteins to remove traces of contaminating antibodies.
 - The absorbed antibody has been further purified by affinity chromatography on a column with immobilized human kappa light chains.
 - The affinity-isolated antibody has then been degraded with pepsin and the F(ab')₂ fragment isolated by gel filtration.
 - Finally, the F(ab')₂ fragment has been conjugated with allophycocyanin, fluorescein isothiocyanate isomer 1 or R-phycoerythrin.

Immunogen
 Polyclonal immunoglobulin light chains of kappa type isolated from a pool of human sera.

Specificity
 Anti-Kappa Light Chains reacts with free kappa chains as well as kappa chains in intact immunoglobulin molecules. The specificity has been ascertained as described below. To obtain maximum sensitivity, the crossed immunoelectrophoresis specificity test was performed prior to affinity purification and pepsin degradation.

Crossed immunoelectrophoresis: Only kappa-related precipitates appear when the antibody is run against human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue.

Flow cytometry: When Anti-Kappa Light Chains is applied as described in the staining procedure in combination with Anti-CD19/RPE, HD37, or Anti-CD19/FITC, HD37 on lysed human whole blood, a specific staining of a part of the CD19-positive B lymphocytes is seen corresponding to the expected range of kappa light chain expression.

Flow cytometric analysis of single cell suspensions from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples demonstrated that Anti-Kappa Light Chains labels reactive hyperplastic lymph nodes (10/10 cases). In non-Hodgkin's lymphomas, the antibody labelled 4/10 cases (5). The remaining cases were positive for lambda light chains (5/10 cases) or showed no expression of light chains (1/10 case) (4).

Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes demonstrated that Anti-Kappa Light Chains labels a proportion of B-cell chronic lymphocytic leukaemias. Thus, in one study of 121 cases (2), 37 were positive for kappa. In another study of 165 cases (3), 97 were positive for kappa.

- Precautions**
- For professional users.
 - This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
 - As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

Storage
 Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. During storage a small precipitate may occasionally develop causing a fine granular non-specific staining. By a simple filtration (0.22 µm cellulose acetate filter), the original high quality of the conjugate will be restored. Conjugates should not be stored in diluted form. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

Procedural note
 Before staining samples of peripheral blood, the mononuclear cells must be isolated by centrifugation on a separation medium or the blood sample washed to remove the soluble serum proteins. As human monocytes bind serum immunoglobulins via their surface Fc receptors, these cells should be removed by depletion or identified.

- Staining procedure**
- Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.
 - Transfer 100 µL of the anticoagulated blood into the test tube.
 - Add 2 mL of 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.
 - Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.
 - Repeat steps 3 and 4 two more times.
 - Add 10 µL rabbit immunoglobulin fraction, code No. X0903, for blocking. Mix gently by using a vortex mixer and incubate in the dark at 37 °C for 30 minutes.
 - Add 10 µL of fluorochrome-conjugated Anti-Kappa Light Chains. Mix gently.

(102451-002) C0222/F0434/R0436/EFG/SSA/31.08.04 p. 1/4

- Use a non-reactive F(ab')₂ fragment of rabbit immunoglobulin, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
- Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
- Add 1-2 mL of erythrocyte-lysing reagent to each tube and mix gently. Follow the reagent manufacturer's recommendations for time and temperature of incubation.
- Centrifuge at 300 x g for 5 minutes.
- Aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.
- Add 2 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.
- Repeat steps 11 and 12.
- Resuspend pellet in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
- Analyse on a flow cytometer.

It is recommended to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control. Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

FRANÇAIS

Intérêt
 Pour diagnostic in vitro.

Les C0222, F0434 et le R0436 sont destinés à l'utilisation en cytométrie en flux. En cytométrie en flux, les anticorps aux chaînes légères kappa ainsi qu'une gamme d'autres anticorps servent à la mise en évidence des chaînes légères kappa de surface cellulaire, et, ainsi, à l'identification de la monoclonalité (excès clonal) dans les syndromes lymphoprolifératifs des lymphocytes B (1-4). L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics.

Introduction
 La plupart des lymphocytes B (à l'exception des cellules souches pré-B et des cellules pré-B) et des plasmocytes matures, expriment de l'immunoglobuline à leur surface. Chaque cellule n'exprime qu'un type de chaîne légère. Dans le sang périphérique normal et dans les ganglions lymphatiques, un mélange est exprimé de cellules positives à kappa et à lambda, dont les deux-tiers expriment une chaîne légère kappa et un tiers exprime une chaîne légère lambda (5). Les néoplasmes lymphoïdes étant en général des expansions clonales d'une cellule unique, les cellules tumorales expriment toujours le même isotype de chaîne légère. Le syndrome lymphoprolifératif néoplasique du lymphocyte B peut souvent être détecté par la détermination d'une prédominance marquée de cellules exprimant un seul type de chaîne légère (4). Des cas rares de lymphomes non hodgkiniens à lymphocyte B négatif à lambda ou négatif à kappa ont été rapportés (4, 6).

Réactif fourni
 Les conjugués anti-Kappa à chaînes légères, C0222, F0434 et R0436, ont été produits à partir d'un fragment F(ab')₂ d'anticorps polyclonal de lapin isolé par affinité. Les conjugués sont fournis à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et du NaN₃ à 15 mmol/L, pH 7,2. Chaque flacon contient 100 tests (10 µL de conjugué pour jusqu'à 10⁶ leucocytes de sang humain périphérique normal).

Conjugate concentration q/L: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du Contrôle Négatif
C0222	APC (Allophycocyanine)	X0998
F0434	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X0929
R0436	RPE (R-Phycoérythrine)	X0930

- Préparation de l'échantillon**
- L'anticorps utilisé pour la conjugaison à APC, à FITC et à (RPE) a été absorbé à l'état solide avec des protéines de plasma humain pour éliminer les traces d'anticorps contaminants.
 - L'anticorps absorbé a été plus amplement purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne à chaînes kappa humaines immobilisées.
 - L'anticorps isolé par affinité a ensuite été dégradé avec de la pepsine et le fragment F(ab')₂ a été isolé par chromatographie de filtration sur gel.
 - Enfin, le fragment F(ab')₂ a été conjugué avec l'allophycocyanine, l'isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine ou la phycoérythrine R.

Immunogène
 Les chaînes légères de type kappa des immunoglobulines polyclonales, isolées du plasma humain.

Spécificité
 Anti-Kappa Light Chains montrent une réaction aux chaînes kappa libres, ainsi qu'aux chaînes kappa des molécules d'immunoglobuline restées intactes. Sa spécificité a été déterminée de la manière décrite ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité d'immunoelectrophorèse croisée a été effectué avant la purification par affinité et la dégradation à la pepsine.

Immuno-électrophorèse croisée: Seuls des précipités liés à kappa apparaissent lorsque l'anticorps est testé pour du plasma humain. Marquage : Bleu de Coomassie.

Cytométrie de flux: Lorsque les chaînes légères anti-kappa sont appliquées de la manière décrite comme indiqué dans la procédure de coloration en combinaison avec l'Anti-CD19/RPE, HD37, ou avec l'Anti-CD19/FITC, HD37 sur du sang total humain lysé, on peut observer une coloration spécifique d'une partie des lymphocytes B positifs pour le CD19, ce qui correspond à la gamme attendue de l'expression de la chaîne légère kappa.

L'analyse en cytométrie de flux de suspensions unicellulaires de prélèvements de tissus fixés dans le formol et inclus dans de la paraffine a permis de démontrer que les chaînes légères anti-kappa marquent les ganglions lymphatiques hyperplastiques réactifs (dans 10 cas sur 10). Pour les lymphomes non hodgkiniens, l'anticorps a marqué 4 cas sur 10 (5). Les cas restants étaient positifs aux chaînes légères lambda (5 cas sur 10), ou ne laissaient voir aucune expression de chaînes légères (1 cas sur 10) (4).

L'analyse en cytométrie de flux des lymphocytes du sang périphérique a démontré que l'anticorps des chaînes légères anti-Kappa marque un certain nombre des leucémies lymphoïdes chroniques B. Ainsi, dans une étude de 121 cas (2), 37 étaient positifs à kappa. Dans une autre étude de 165 cas (3), 97 étaient positifs à kappa.

- Précautions d'emploi**
- Pour utilisateurs professionnels.
 - Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique sous forme pure. Aux concentrations du produit, bien que n'étant pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie.
 - Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.

Conservation
 Stocker à l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont stockés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité du produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. Au cours du stockage, un petit précipité peut se développer entraînant un marquage granulaire non-spécifique. Il est possible de rétablir la qualité optimale initiale du conjugué par simple filtration (filtre d'acétate de cellulose de 0,22 µm). Les conjugués ne doivent pas être stockés sous forme diluée. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos services techniques

(102451-002) C0222/F0434/R0436/EFG/SSA/31.08.04 p. 2/4

Remarques relatives à la procédure

Avant le marquage des échantillons de sang périphérique, les cellules mononukleären doivent être isolées par centrifugation sur un milieu de séparation ou bien l'échantillon de sang doit être lavé pour enlever les protéines de sérum solubles. Les monocytes humains liant les immunoglobulines sériques via leurs récepteurs Fc, ces cellules doivent être enlevées par déplétion ou bien être identifizées.

Procédure d’immunomarkuage

- Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.
- Transférer 100 µL de sang coagulé dans un tube à essais.
- Ajouter 2 mL de PBS à 0,01 mol/L, pH 7,4. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex
- Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant, laissant approximativement 50 µL de liquide.
- Répéter deux fois supplémentaires les étapes 3 et 4.
- Ajouter 10 µL rabbit immunoglobulin fraction, code No. X0903, pour bloquer. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex et incuber dans l'obscurité pendant 30 minutes à 37°C.
- Ajouter 10 µL de fluorochrome-conjugated Anti-Kappa Light Chains. Mélanger délicatement.
- Utiliser un fragment F(ab')2 non réactif d’immunoglobuline de lapin, et conjugué dans le même fluorochrome, comme étant le contrôle négatif (voir tableau).
- Incuber à l’obscurité à 4 °C pendant 30 minutes.
- Ajouter 1-2 mL de réactif lysant d'érythrocyte dans chaque tube et mélanger délicatement. Se reporter aux recommandations du fabricant pour la durée et la température d'incubation.
- Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes.
- Aspirer le surnageant laisser 50 µL de liquide.
- Ajouter 2 mL de PBS à 0,01 mol/L, pH 7,4. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex
- Recommencer les étapes 11 et 12.
- Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour cytométrie en flux, comme 0,3 mL d'une solution à 1% de paraformaldéhyde (fixateur) dans du PBS à 0,01 mol/L, pH 7,4.
- Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif adéquat à chacune des exécutions pour le contrôle du réactif et de la préparation.
Noter que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, et les échantillons doivent être protégés de cette dernière au cours de la procédure d’immunomarkuage et jusqu'à l'analyse.

<p>DEUTSCH</p>
<p></p>

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

C0222, F0434 und R0436 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. n der Durchfluss-Zytometrie sind Antikörper gegen Kappa-Leichtketten beim Nachweis von Kappa-Leichtketten auf der Zelloberfläche nützlich und sind daher - zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper – bei der Identifikation von Monoklonalität (klonaler Überschuss) bei lymphoproliferativen Erkrankungen der B-Zellen behilflich (1-4). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

Einleitung

Die meisten B-Zellen - mit Ausnahme der Prä-B-Vorläuferzellen, Prä-B-Zellen und reifen Plasamazellen – exprimieren ebenso wie ausgereifte Plasmazellen Immnglobulin auf ihrer Oberfläche. Jede Zelle exprimiert nur einen Leichtketten-Typ. In normalem peripherem Blut und Lymphknoten liegt eine Mischung aus Kappa-positiven und Lambda-positiven Zellen vor, wobei zwei Drittel der Zellen Kappa und ein Drittel Lambda exprimieren (5). Da lymphoide Neoplasmen normalerweise klonale Expansionen einer einzigen Zelle darstellen, exprimieren maligne Zellen einheitlich den gleichen Leichtketten-Isotyp. Neoplastische lymphoproliferative Störungen der B-Zellen können häufig auf Grundlage des Nachweises einer ausgeprägten Vorherrschaft von Zellen vermutet werden, die einen einzigen Leichtketten-Typ exprimieren (4). Es sind seltene Fälle von Kappa-negativen oder Lambda-negativen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zellen beschrieben worden (4,6).

Geliefertes Reagenz

Die Anti-Kappa Light Chains Konjugate C0222, F0424 und R0436 werden aus einem F(ab')2–Fragment des affinitätsisolierten polyklonalen Kaninchenantikörpers hergestellt. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN3, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 µL des Konjugats sind für bis 10⁶ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Konjugat-Konzentration q/L: Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.
C0222	APC (Allophycocyanin)	X0998
F0434	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X0929
R0436	RPE (R-Phycoerythrin)	X0930

Präparation

- Der für die APC, FITC- und RPE-Konjugation verwendete Antikörper wurde zur Entfernung von Spuren kontaminierender Antikörper mit menschlichen Plasmaproteinen in der Festphase absorbiert.
- Der absorbierte Antikörper wurde weitergehend mit Hilfe der Affinitätschromatografie auf einer Säule mit immobilisierten menschlichen Kappa-Leichtketten gereinigt.
- Daraufhin erfolgte der Abbau des affinitätsisolierten Antikörpers mit Pepsin und das F(ab')2-Fragment wurde anhand der Gelfiltration isoliert.
- Abschließend wurde der F(ab')2-Anteil mit Allophycocyanin, Fluorescein-Isothiocyanat, Isomer 1, oder R-Phycoerythrin konjugiert.

Immunogen

Aus einem Humanseren-Pool isolierte polyklonale Immnglobulin-Leichtketten vom Kappa-Typ.

Spezifität

Anti-Kappa Light Chains reagieren mit freien Kappa-Ketten sowie Kappa-Ketten in intakten Immnglobulinmolekülen. Die Spezifität wurde wie unten beschrieben ermittelt. Zum Erzielen maximaler Sensitivität wurde der Kreuz-Immunelektrophorese-Spezifitätstest vor der Affinitätsreinigung und der proteolytischen Spaltung mit Pepsin durchgeführt.

Kreuzimmunelektrophorese: Bei der Analyse des Antikörpers gegen humanes Plasma erscheint nur die halbmondförmige Kappa-bezogene Präzipitationslinie. Anfärben: Coomassie® Brillantblau.

Durchflusszytometrie: Wenn Anti-Kappa Light Chains beim Färbeverfahren wie beschrieben in Kombination mit Anti-CD19/RPE, HD37 oder Anti-CD19/FITC, HD37, bei lysiertem menschlichem Vollblut angewendet werden, wird eine spezifische Färbung eines Teils der CD19-positiven B-Lymphozyten beobachtet, die dem erwarteten Bereich der Expression von Kappa-Leichtketten entspricht.

Die durchflusszytometrische Analyse der Einzelzell-Suspensionen aus formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeproben zeigt auf, dass Anti-Kappa Light Chains reaktive hyperplastische Lymphknoten markieren (10/10 Fälle). Bei Non-Hodgkin-Lymphomen markierte der Antikörper 4/10 Fälle (5). Die verbleibenden Fälle waren für Lambda-Leichtketten positiv (5/10 Fälle) oder zeigten keine Expression von leichten Ketten (1/10 Fällen) (4).

(102451-002)	C0222/F0434/R0436/EFG/SSA/31.08.04 p. 3/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

Die durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten aus peripherem Blut verdeutlicht, dass Anti-Kappa Light Chains einen Teil der Fälle mit chronischen lymphozytären Leukämien der B-Zellen markieren. So testeten in einer Studie von 121 (2) Fällen 37 positiv auf Kappa. In einer anderen Studie von 165 Fällen testeten 97 Kappa-positiv (3).

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN3), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
- Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.

Lagerung

Im Dunkeln bei 2–8°C lagern. Nicht nach dem auf dem Produkt angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Während der Lagerung kann sich mitunter ein geringfügiges Präzipitat bilden, das eine unspezifische, feine granuläre Anfärbung bewirkt. Durch einfache Filtrierung (0,22 µm Zellulose-Azetat-Filter) wird die ursprüngliche hohe Qualität des Konjugats wiederhergestellt. Konjugate sollten nicht in verdünnter Form gelagert werden. Wenn unerwartete Anfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

Verfahrenshinweis






Vor dem Färben von Proben aus peripherem Blut müssen die mononukleären Zellen durch Zentrifugieren auf einem Separationsmedium isoliert oder die Blutprobe muss gewaschen werden, um die löslichen Serumproteine zu entfernen. Da menschliche Monozyten Serumimmnglobuline über ihre Fc-Oberflächenrezeptoren binden, müssen diese Zellen durch Depletion entfernt oder identifiziert werden.

Färbeprozedur

- Venöses Blut in ein Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
- 100 µL des Antikoagulans-versetzten in das Probenröhrchen pipettieren.
- 2 ml 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, zusetzen. Mit einem Vortexmixer vorsichtig mischen.
- 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren, dann den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µL zurückbleiben.
- Schritte 3 und 4 zwei Mal wiederholen.
- 10 µL Kaninchenimmunglobulin-Fraktion, Code-Nr. X0903, zur Blockierung hinzufügen. Vorsichtig mit einem Vortexmixer mischen und dann im Dunkeln 30 Minuten lang bei 37°C inkubieren.
- 10 µL Fluorochrom konjugiertes Anti-IgM hinzufügen. Vorsichtig mischen.
- Ein nicht-reaktives F(ab')2-Fragment des Kaninchenimmunglobulins, das mit dem gleichen Fluorochrom konjugiert ist, als Negativkontrolle verwenden (siehe Tabelle).
- Im Dunkeln bei 4°C 30 Minuten lang inkubieren.
- In jedes Röhrchen 1-2 mL Erythrozyten lysierendes Reagenz pipettieren und vorsichtig mischen. Die Anleitungen des Reagenz-Herstellers bezüglich Inkubationszeit und -temperatur befolgen.
- 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren.
- Den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µL Flüssigkeit zurückbleiben.
- 2 mL 0,01 mol/L, PBS, pH 7,4, zusetzen. Mit einem Vortexmixer vorsichtig mischen.
- Schritte 11 und 12 wiederholen.
- Das Pellet in einer für die Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 1% Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, resuspendieren.
- Im Durchflusszytometer analysieren.

Es wird empfohlen, eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle für jede Durchführung der Reagenz- und Präparationsprüfung mitzuführen. Es ist zu beachten, dass Fluoreszenzkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während des Färbevorgangs und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

<p>References/ Références/ Literatur</p> <ol style="list-style-type: none">Johnson A, Olofsson T. Flow cytometric clonal excess analysis of peripheral blood, routine handling, and pitfalls in interpretation. Cytometry 1993;14:188-95. 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. 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. Leers MPG, Theunissen PHMH, Ramaekers FCS, Schutte B, Nap M. Clonality assessment of lymphoproliferative disorders by multiparameter flow cytometry of paraffin-embedded tissue: an additional diagnostic tool in surgical pathology. Hum Pathol 2000;31:422-7. 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. Kaleem Z, Zehnbauer BA, White G, Zutter MM. Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in B-cell non-Hodgkin lymphomas. Am J Clin Pathol 2000;113:399-405.	
--	--

<p>Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole</p>			
<p>REF</p>	<p>Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer</p>	<p> Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	<p> Use by Utiliser jusque Verwendbar bis</p>
<p>IVD</p>	<p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum</p>	<p> Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)</p>	<p> Manufacturer Fabricant Hersteller</p>
<p></p>	<p>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	<p>LOT</p>	<p>Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung</p>

(102451-002)	C0222/F0434/R0436/EFG/SSA/31.08.04 p. 4/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	