

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

**Code F0189**  
**Code R5112**

**ENGLISH**

**Intended use**

For in vitro diagnostic use.

F0189 and R5112 are intended for use in flow cytometry. In flow cytometry, antibodies to IgD are useful for the demonstration of cell surface IgD, and, thus, for the subtyping of B-cell lymphoproliferative disorders together with a panel of other antibodies (1-6). 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 progenitor and pre-B cells, and mature plasma cells, express immunoglobulin on their surface. Pre-B cells express cytoplasmic  $\mu$ -chains but no light chains, whereas the early B lymphocytes express membrane IgM only. The maturing B lymphocytes additionally produce IgD that is inserted into the cell membrane joining IgM and establishing a population of IgM+IgD+ B lymphocytes, which is the largest population of circulating B lymphocytes in man. Subsequent re-arrangement of the constant region of the immunoglobulin heavy chain genes results in cells expressing membrane IgG or IgA, initially in concert with IgM or IgD. Antigen exposure activates the production of these cells. They may evolve from less mature B precursors in a primary response, or from memory cells in a secondary response (7). B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells are commonly positive both for surface IgM and IgD (2-6). Moreover, IgM- and IgD-positive cases are frequently seen in B-cell polymorphocytic leukaemia, hairy cell leukaemia, splenic lymphoma with villous lymphocytes, mantle cell lymphoma, and follicular cell lymphoma (1, 5).

**Reagent provided**

The Anti-IgD conjugates, F0189 and R5112, have been produced from a F(ab')<sub>2</sub> 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 NaN<sub>3</sub>, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10  $\mu$ L for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood).

Conjugate concentration g/L: See label on vial.

Antibody Code	Fluorochrome	Negative Control Code
F0189	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X0929
R5112	RPE (R-phycoerythrin)	X0930

**Preparation**

1. The antibody used for FITC and RPE conjugation has been solid-phase absorbed with human plasma proteins to remove unwanted antibodies.
2. The absorbed antibody has been further purified by affinity chromatography on a column with human IgD.
3. The affinity-isolated antibody has then been degraded with pepsin and the F(ab')<sub>2</sub> fragment isolated by gel filtration.
4. Finally, the F(ab')<sub>2</sub> fragment has been conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 or R-phycoerythrin.

**Immunogen**

IgD isolated from a human serum pool.

**Specificity**

Anti-IgD reacts with the  $\delta$ -chains of human IgD. The specificity has been ascertained as described below. To obtain maximum sensitivity, the crossed immunoelectrophoresis and ELISA specificity test were performed prior to affinity purification and pepsin degradation.

Crossed immunoelectrophoresis: Only the IgD precipitation arch appears when the antibody is run against human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue.

ELISA: In indirect ELISA no significant reaction is observed with human IgG, IgA, IgM or with serum depleted of IgD.

Flow cytometry: When tested on human lysed whole blood, Anti-IgD labels a subpopulation of the CD19- positive cells.

Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes demonstrate that Anti-IgD labels a proportion of B-CLL. Thus, in one study of 121 cases (3), 1 was positive for IgD only, while an additional 21 cases were positive for both IgD and IgM. In another study of 165 cases (4), 117 were positive for IgD and a number of these cases were also positive for IgM.

**Precautions**

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), 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.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

**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  $\mu$ m 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 Dako 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**

1. Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.
2. Transfer 100  $\mu$ L of the anticoagulated blood into the test tube.
3. Add 2 mL of 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.
4. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50  $\mu$ L of fluid.
5. Repeat steps 3 and 4 two more times.
6. Add 10  $\mu$ L rabbit immunoglobulin fraction, code X0903, for blocking. Mix gently by using a vortex mixer and incubate in the dark at 37 °C for 30 minutes.
7. Add 10  $\mu$ L of fluorochrome-conjugated Anti-IgD. Mix gently.

8. Use a non-reactive F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit immunoglobulins, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
9. Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
10. 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.
11. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes.
12. Aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.
13. Add 2 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Mix gently by using a vortex mixer.
14. Repeat steps 11 and 12.
15. 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.
16. 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*.

F0189 et le R5112 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. En cytométrie de flux, les anticorps IgD ainsi qu'une gamme d'autres anticorps servent à la mise en évidence de l'IgD de surface cellulaire, et, ainsi, au sous-typage des syndromes lymphoprolifératifs des lymphocytes B (1-6). L'interprétation doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'historique 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. Les cellules pré-B expriment des chaînes µ cytoplasmiques mais pas de chaînes légères, tandis que les lymphocytes B au stade précoce expriment seulement l'IgM membranaire. Les lymphocytes B en cours de maturation produisent également de l'IgD insérée dans la membrane cellulaire, fixant l'IgM et créant une population de lymphocytes B IgM-IgD+, qui représente la population la plus importante de lymphocytes B circulants chez l'homme. Un réarrangement consécutif de la région constante des gènes de la chaîne lourde d'immunoglobuline permet d'obtenir des cellules exprimant l'IgG ou IgA membranaire, ainsi que, au départ, l'IgM ou IgD. L'application d'antigènes active la production de ces cellules. Elles peuvent évoluer à partir de précurseurs B moins matures dans une réponse primaire, ou à partir de cellules-mémoire dans une réponse secondaire (7). Les cellules de la leucémie lymphoïde chronique B (B-CLL) sont généralement positives à la fois à l'IgM et à l'IgD de surface (2-6). De plus, on observe fréquemment des cas positifs à l'IgM et l'IgD dans la leucémie prolymphocytaire B de Galton, la leucémie à tricholeucocytes, le lymphome splénique à lymphocytes vilieux, le lymphome du manteau et le lymphome à cellule folliculaire (1, 5).

### Réactif fourni

Les conjugués anti-IgD, F0189 et R5112, ont été produits à partir d'un fragment F(ab)<sub>2</sub> d'anticorps polyclonal de lapin isolé par affinité. Les conjugués sont fournis à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/l de NaN<sub>3</sub>, à 7,2 de pH. Chaque flacon contient 100 tests (10 µl de conjugué pour jusqu'à 10<sup>6</sup> leucocytes de sang humain périphérique normal).

Concentration du conjugué g/l : Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Code de l' anticorps	Fluor	Code du Contrôle Négatif
F0189	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X0929
R5112	RPE (R-phycoérythrine)	X0930

### Préparation de l'échantillon

1. L'anticorps utilisé pour la conjugaison à FITC et à RPE a été absorbé à l'état solide avec des protéines de plasma humain afin d'ôter les anticorps non désirés.
2. L'anticorps absorbé a été plus amplement purifié par chromatographie d'affinité sur colonne avec de l'IgD humaine immobilisée.
3. L'anticorps isolé par affinité a ensuite été dégradé avec de la pepsine et le fragment F(ab')<sub>2</sub> a été isolé par chromatographie de filtration sur gel.
4. Enfin, le fragment F(ab')<sub>2</sub> a été conjugué avec l'isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine ou la phycoérythrine R.

### Immunogène

IgD isolée du sérum humain.

### Spécificité

L'anti-IgD montre une réaction aux 8 chaînes de l'IgD humaine. Sa spécificité a été déterminée de la manière décrite ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, les tests de spécificité d'immunoélectrophorèse croisée et d'ELISA ont été effectués avant la purification par affinité et la dégradation à la pepsine.

Immuno-électrophorèse croisée : L'arc de précipitation de l'IgD apparaît seulement lorsque l'anticorps est utilisé pour du plasma humain. Marquage: Bleu de Coomassie.

ELISA : En ELISA indirect, aucune réaction significative n'est observée avec l'IgG, IgA, IgM humain, ou avec du sérum dont on a ôté l'IgD.

Cytométrie de flux : Lorsqu'elle est testée avec des cellules d'amygdale humaine, l'anti-IgD marque une sous-population de cellules positives au CD19.

L'analyse en cytométrie de flux des lymphocytes du sang périphérique démontre que l'anti-IgD marque une proportion des B-CLL. Ainsi, dans une étude de 121 cas (3), 1 étaient positifs à l'IgD uniquement, tandis que 21 cas supplémentaires étaient à la fois positifs à l'IgD et l'IgM. Dans une autre étude de 165 cas (4), 117 étaient positifs à l'IgD, et plusieurs de cas étaient également positifs à l'IgM.

### Précautions d'emploi

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), un composé chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit 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.
3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

### Stockage

Conservé à l'obscurité entre 2° et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles spécifiées, ces conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce 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 léger 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 Dako Services Techniques.

### Remarques relatives à la procédure

Avant le marquage des échantillons de sang périphérique, les cellules mononucléaires 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 lient les immunoglobulines sériques via leurs récepteurs Fc, ces cellules doivent être enlevées par déplétion ou bien être identifiées.

### Procédure d'immunomarquage

1. Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.
2. Transférer 100µl de sang anti-coagulé dans le tube à essai.
3. Ajouter 2 ml de PBS à 0,01 mol/l, pH 7,4. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex.
4. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant, en laissant environ 50 µl de fluide.
5. Répéter deux fois supplémentaires les étapes 3 et 4.
6. Ajouter 10 µl de fraction d'immunoglobuline de lapin, code X0903 pour bloquer. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex et incubé dans l'obscurité pendant 30 minutes à 37°C.
7. Ajouter 10 µl d'anti-IgD conjugué au fluorochrome. Mélanger délicatement.
8. Utiliser un fragment F(ab')<sub>2</sub> non réactif d'immunoglobulines de lapin, et, conjugué avec le même fluorochrome, l'utiliser comme contrôle négatif (voir tableau).
9. Incuber à l'obscurité à 4 °C pendant 30 minutes.
10. 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.
11. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes.
12. Aspirer le surnageant, en laissant environ 50 µl de fluide.
13. Ajouter 2 ml de PBS à 0,01 mol/l, pH 7,4. Mélanger délicatement à l'aide d'un agitateur de type vortex.
14. Recommencer les étapes 11 et 12.
15. 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.
16. Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un contrôle positif et négatif adéquats à chaque technique pour contrôler le réactif et la préparation. Remarquer que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, les échantillons doivent donc être protégés de cette dernière au cours de la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.

## DEUTSCH

### Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

F0189 und R5112 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. In der Durchfluss-Zytometrie sind Antikörper gegen IgD beim Nachweis von Zelloberflächen-IgD nützlich und helfen daher bei der Einordnung von lymphoproliferativen Erkrankungen der B-Zellen in Untertypen zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper (1-6). 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 und Prä-B-Zellen – exprimieren ebenso wie ausgereifte Plasmazellen Immunglobulin auf ihrer Oberfläche. Prä-B-Zellen exprimieren zytoplasmatische µ-Ketten, jedoch keine leichten Ketten, während die jungen B-Lymphozyten nur Membran-IgM exprimieren. Reifende B-Lymphozyten produzieren zusätzlich IgD, das zu IgM hinzutretend in die Zellmembran eingefügt wird und eine Population von IgM+IgD+B-Lymphozyten etabliert, welche beim Menschen die größte Population zirkulierender B-Lymphozyten darstellt. Das nachfolgende Rearrangement der konstanten Region der Immunglobulin-Schwerkettengene resultiert in Zellen, die - anfänglich gemeinsam mit IgM oder IgD – membranöses IgG oder IgA exprimieren. Antigenexposition aktiviert die Produktion dieser Zellen. Sie können als Primärantwort aus weniger ausgereiften B-Vorläufern oder als Sekundärantwort aus Gedächtniszellen entstehen (7). Zellen bei Chronischer Lymphatischer B-Zell-Leukämie (B-CLL) reagieren im Allgemeinen positiv sowohl auf Oberflächen-IgM als auch -IgD (2-6). IgM- und IgD-positive Fälle kommen zudem häufig bei B-Zell-Prolymphozytenleukämie (B-PLL), Haarzellenleukämie, Milzlymphom mit zottigen Lymphozyten, Mantelzellymphom und follikulärem Zellymphom vor (1, 5).

### Geliefertes Reagenz

Die Anti-IgD-Konjugate F0189 und R5112 werden aus einem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des affinitätsisolierten polyklonalen Kaninchenantikörpers hergestellt. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, pH 7,2, geliefert.. Jedes Fläschchen ist für 100 Tests ausreichend (10 µl Konjugat ist für bis zu 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem humanem peripherem Blut ausreichend).

Konjugat-Konzentration g/l: Siehe Produktetikett.

Antikörper Code	Fluorochrom	Negativkontrolle Code
F0189	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X0929
R5112	RPE (R-Phycoerythrin)	X0930

### Präparation

1. Der für die FITC- und RPE-Konjugation verwendete Antikörper wurde zur Entfernung unerwünschter Antikörper mit menschlichen Plasmaproteinen in der Festphase absorbiert.
2. Der absorbierte Antikörper wurde durch Affinitätschromatografie auf einer Säule mit humanem IgD weiter gereinigt.
3. Daraufhin erfolgte der Abbau des affinitätsisolierten Antikörpers mit Pepsin und das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment wurde anhand der Gelfiltration isoliert.
4. Abschließend wurde der F(ab')<sub>2</sub>-Anteil mit Fluorescein-Isothiocyanat, Isomer 1, oder R-Phycoerythrin konjugiert.

### Immunogen

Aus gepooltem Humanserum isoliertes IgD.

### Spezifität

Anti-IgD reagiert mit den δ-Ketten des humanen IgD. Die Spezifität wurde wie unten beschrieben ermittelt. Zum Erzielen maximaler Sensitivität wurden die Kreuz-Immunelektrophorese- und die ELISA-Spezifitätstests vor der Affinitätsreinigung und der proteolytischen Spaltung mit Pepsin durchgeführt.

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

ELISA: Beim indirektem ELISA wird keine bedeutende Reaktion mit humanem IgG, IgA, IgM oder humanem Serum, dessen IgD entfernt worden ist, beobachtet.

Durchflusszytometrie: Beim Testen an lysiertem humanem Vollblut markiert Anti-IgD eine Subpopulation der CD19-positiven Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten aus dem peripheren Blut demonstriert, dass Anti-IgD einen Teil der Fälle einer B-CLL markiert. So testeten in einer 121 Fälle umfassenden Studie (3) 1 Fall nur IgD-positiv, während weitere 21 Fälle sowohl IgD- als auch IgM-positiv waren. In einer weiteren, 165 Fälle einbeziehenden Studie (4) testeten 117 IgD-positiv und eine Reihe dieser Fälle waren ebenfalls IgM-positiv.

### Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN<sub>3</sub>), 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.
3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.

5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen

#### 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. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

#### 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 Serumimmunglobuline über ihre Fc-Oberflächenrezeptoren binden, müssen diese Zellen durch Depletion entfernt oder identifiziert werden.

#### Färbeprozedur










1. Venöses Blut in ein Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
2. 100 µl des Antikoagulans-versetzten in das Probenröhrchen pipettieren.
3. 2 ml 0,01 mol/l PBS, pH 7,4, zusetzen. Mit einem Vortexmixer vorsichtig mischen.
4. 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren, dann den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µl zurückbleiben.
5. Schritte 3 und 4 zwei Mal wiederholen.
6. 10 µl Kaninchenimmunglobulin-Fraktion, Code X0903, zur Blockierung hinzufügen. Vorsichtig mit einem Vortexmixer mischen und dann im Dunkeln 30 Minuten lang bei 37 °C inkubieren.
7. 10 µl mit Fluorochrom-konjugiertes Anti-IgD hinzufügen. Vorsichtig vermischen.
8. Ein nicht-reaktives F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des Kaninchenimmunglobulins, das mit dem gleichen Fluorochrom konjugiert ist, als Negativkontrolle verwenden (siehe Tabelle).
9. Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
10. In jedes Röhrchen 1-2 ml Erythrozyten lysierendes Reagenz pipettieren und vorsichtig mischen. Die Anleitungen des Reagenz-Herstellers bezüglich Inkubationszeit und -temperatur befolgen.
11. 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren.
12. Den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µl Flüssigkeit zurückbleiben.
13. 2 ml 0,01 mol/l, PBS, pH 7,4, zusetzen. Mit einem Vortexmixer vorsichtig mischen.
14. Schritte 11 und 12 wiederholen.
15. Das Pellet in einer für die Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 ml 1%igem Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/l PBS, pH 7,4, resuspendieren.
16. 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 Färbeprozesses und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

#### References/ Références/ Literatur

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.

#### Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum		Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'abri de la lumière (voir la section Conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung	 EC REP	Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft



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

Revision / Révision / Revision 2020.11