

remel

DE

Phytohämagglutinin (Analysenreagenz)

VERWENDUNGSZWECK

Phytohämagglutinin wird verwendet, um die Mitose von Lymphozyten in einem Zellkultursystem zu stimulieren und zytogenetische Studien der Chromosomen zu erleichtern.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS^{3,5,6}

Phytohämagglutinin (PHA) ist der Freiname wässriger Extrakte aus den Samen bestimmter Pflanzen, vor allem aus *Phaseolus* spp. Ursprünglich wurde PHA aufgrund seiner starken Erythrozyten-agglutinierenden Wirkung² zur Trennung von Leukozyten aus Vollblut verwendet. Später fand man heraus, dass durch PHA eine progressive Mitose von Lymphozyten in einer Gewebeskultur hervorgerufen wird⁴.

Nach den folgenden Erkenntnissen erwies sich PHA als allgemein effektivstes und optimal geeignetes Stimulus für Lymphozyten von zahlreichen Tierarten. Die weit verbreitete Popularität von Kulturen aus peripherem Blut als Mittel zur Chromosomenanalyse ist zum großen Teil auf diese Eigenschaft zurückzuführen.

GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Zur Durchführung dieses Verfahrens muss eine geeignete Lymphozytenkultur angelegt werden, zu der PHA gegeben wird. Dadurch wird die Mitose stimuliert, die in der Metaphase durch Zugabe von Colcemid (Desacetyl-Methylcolchicin) zum Stillstand gebracht wird. In dieser Phase sind die Chromosomen am deutlichsten erkennbar. Die Probe wird mit hypotoner Lösung behandelt. Dadurch schwellen die Zellen an, und durch die Lyse der Erythrozyten können die Chromosomen in angemessen fixierten und gefärbten Präparaten auf Objektträgern identifiziert werden.

REAGENZ

INHALT DES KITS

Phytohämagglutinin (Analysenreagenz)	
HA15/R30852701	1 Fläschchen

BESCHREIBUNG, VORBEREITUNG UND EMPFOHLENE LAGERUNGSBEDINGUNGEN

Siehe auch **Vorsichtsmaßnahmen**.



Die Reaktivität des lyophilisierten Materials bleibt mindestens bis zu dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Datum erhalten, sofern es bei 2 - 8°C gelagert wird.

PHYTO-HAEMAGGLUTININ

Phytohämagglutinin (Analysenreagenz)

Phytohämagglutinin (Analysenreagenz) ist ein lyophilisiertes Präparat eines wässrigen Extrakts aus ausgewählten Saatbohnen der Sorte *Phaseolus* spp. Jedes Fläschchen enthält ca. 45 mg lyophilisiertes Extrakt.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes PHA sollte durch Zugabe von 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung mit einer sterilen Einweg-Spritze für subkutanen Injektion rekonstituiert werden. Die Verwendung anderer Lösungen kann zu Trübungen führen. Der Verschluss des Fläschchens sollte sterilisiert werden, indem er mit Äther abgewischt wird. Die Nadel sollte durch die Mitte des Stopfens gestochen und bei der Rekonstitution senkrecht gehalten werden.

Rekonstituiertes Material sollte bei 2 - 8°C gelagert und innerhalb eines Monats verwendet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zur Verwendung durch Fachpersonal.

Hinweise auf potentiell gesundheitsgefährdende Substanzen entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern des Herstellers und den Produktetiketten.

SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

- Wiederverwendbare Geräte müssen nach Gebrauch durch geeignete Verfahren sterilisiert werden, vorzugsweise durch Autoklavieren bei 121°C, mindestens 15 Minuten lang. Einwegmaterialien müssen autoklaviert oder verbrannt werden.
- Verschüttetes oder verspritztes potentiell infektiöses Material muss sofort mit saugfähigen Papiertüchern entfernt und die kontaminierten Flächen mit einem herkömmlichen, bakterienabtötenden Desinfektionsmittel oder 70%igem Alkohol gereinigt werden. Das zum Entfernen von Spritzern verwendete Material (auch Handschuhe) muss als infektiöser Abfall entsorgt werden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren. Bei der Handhabung von Proben oder bei der Testdurchführung Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen. Nach Beendigung des Verfahrens die Hände gründlich waschen.
- In Übereinstimmung mit den GLP-Richtlinien gelten alle Proben als potentiell infektiös und müssen mit äußerster Vorsicht gehandhabt werden.

WICHTIGE HINWEISE ZUR HANDHABUNG

- Material, das Anzeichen einer bakteriellen Kontamination aufweist, sollte verworfen werden. Bisweilen kommt es ohne Bakterienwachstum zu einer leichten Trübung. Dadurch werden die Eigenschaften von PHA nicht beeinträchtigt.
- Aseptische Verfahren sind von entscheidender Bedeutung.
- Das Reagenz nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.

PROBENENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

PROBENENTNAHME⁶

Der Erfolg einer zytogenetischen Analyse anhand von Vollblutkulturen hängt von der Konzentration normal funktionstüchtiger Lymphozyten zur Zeit der Probenentnahme ab. Da diese Konzentration durch eine Infektion oder Medikamente beeinflusst werden kann, sollten Personen, denen Proben für zytogenetische Studien entnommen werden, möglichst 7 Tage vor der Blutentnahme für die Tests keine Medikamente eingenommen haben. Ebenso kann der Mitoseindex während anergischer Phasen bestimmter Krankheiten (z. B. Hodgkin-Krankheit, Sarkoidose usw.) beträchtlich, und in geringerem Maße bei gesunden Frauen während der letzten Phasen der Schwangerschaft vermindert werden.

Blutproben für Lymphozytenkulturen dürfen nicht mit Konservierungsmitteln versetzt werden. Aseptische Verfahren sind von entscheidender Bedeutung.

LAGERUNG DER PROBE

Blutproben sollten unverzüglich getestet werden, sofern dies möglich ist. Wenn es unbedingt notwendig ist, können sie maximal 48 Stunden lang bei 2 - 8°C gelagert werden.

TESTVERFAHREN

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Siehe **Inhalt des Kits**.

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND GERÄTE

- Mikrokultur-Medium
 - Ausreichend für 25 Tests
 - 100 ml Medium RPMI 1640
 - 25 ml fetales Kälberserum
 - 1,25 ml Glutamin (200 mmol/l)
 - 1,25 ml Penizillin (5000 IE/ml)/Streptomycin (5000 µg/ml)
 - 2,5 ml phenolfreies Heparin (1000 IE/ml)
- Colcemid (Sigma Laboratories) 25 µg/ml Lösung.
- 75 mmol/l Kaliumchlorid-Lösung.
- Essig-Alkohol. 1 Teil Eisessigsäure: 3 Teile Methanol (analysenreines Reagenz).
- Giemsa oder 2% Essigsäure-Orzein.
- Fixiermittel.
- Glas-Objektträger und Deckgläser.
- Zentrifugierröhrchen aus Kunststoff.
- Inkubator.
- Tischzentrifuge.
- Vortex-Mischer.
- Lichtmikroskop.

TESTDURCHFÜHRUNG^{1,6}

Bisher wurden Vollblut oder isolierte Leukozyten für zytogenetische Studien verwendet. Die Verwendung von Vollblut ist jedoch am einfachsten und am weitesten bei Routine-Studien verbreitet. Wie bei jedem Zellkulturverfahren werden nur dann optimale Ergebnisse erzielt, wenn adäquate Bedingungen für die Kultur geschaffen werden. Serumzusätze sollten vor Gebrauch untersucht werden, um sicherzustellen, dass nur Chargen gewählt werden, die keine inhibitorische Wirkung haben. Da der relative Gehalt an aktivem PHA von Charge zu Charge leicht variieren kann, ist es möglicherweise von Vorteil, 2 PHA-Konzentrationen zu testen.

A. Vorbereitung von Vollblut-Mikrokulturen

- Schritt 1** 5 - 20 ml frisches Blut in phenolfreies Heparin entnehmen und durch Umdrehen mischen.
- Schritt 2** Phytohämagglutinin durch Zugabe von 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung mit einer sterilen Spritze rekonstituieren.
- Schritt 3** Mit einem aseptischen Verfahren das erforderliche Volumen an Mikrokultur-Medium herstellen (5 ml pro Blutprobe).
- Schritt 4** Das Mikrokultur-Medium in entsprechend markierte sterile Fläschchen mit Schraubverschluss pipettieren, und aseptisch 0,1 ml rekonstituiertes PHA hinzugeben. Unmittelbar vor dem Anlegen der Kultur 0,4 ml heparinisertes Blut mit einer sterilen Einwegspritze hinzugeben.
- Schritt 5** Die Kulturen bei 37°C 72 Stunden lang inkubieren. Jedes Fläschchen täglich durch Umdrehen mischen.
- B. Ernte der Kulturen**
- Schritt 1** Die Fläschchen mit Kultur 1,5 Stunden vor der Ernte aus dem Inkubator nehmen.
- Schritt 2** 0,15 ml Colcemid-Lösung (25 µg/ml) zu jeder Kultur geben.
- Schritt 3** Vorsichtig mischen und wieder in den auf 37°C eingestellten Inkubator stellen.
- Schritt 4** Die Kulturen aus dem Inkubator nehmen und in mit Maßeinheiten versehenen Zentrifugierröhrchen aus Kunststoff überführen, auf denen Probandaten notiert sind.
- Schritt 5** Die Kulturen in einer Tischzentrifuge bei 500 x g 5 Minuten lang zentrifugieren.
- Schritt 6** Die überstehende Flüssigkeit größtenteils entfernen und verwerfen.
- Schritt 7** Den Bodensatz in 6 - 8 ml Kaliumchlorid-Lösung, 75 mmol/l, vorgewärmt auf 37°C, resuspendieren und bei 37°C 10 Minuten lang inkubieren.

Schritt 8 Wie in Schritt 5 beschrieben zentrifugieren und den Überstand verwerfen.

Schritt 9 Mit einer Pasteur-Pipette langsam 6 - 8 ml frisch zubereiteten Essig-Alkohol zu dem Satz geben und dabei ständig auf einem Vortex-Mischer schütteln. Das Fixiermittel zunächst tropfenweise hinzufügen, dann langsam träufeln, damit die Zellen so wenig wie möglich geschädigt werden und sich möglichst wenig Klumpen bilden.

Schritt 10 Bei 2 - 8°C 10 Minuten lang stehenlassen.

Schritt 11 Leicht zentrifugieren, überstehende Flüssigkeit wie oben beschrieben entfernen, und langsam weitere 5 ml Essig-Alkohol hinzufügen, um den Satz zu resuspendieren.

Schritt 12 Schritt 11 noch zweimal wiederholen, und schließlich in 0,5 ml Essig-Alkohol resuspendieren. Diese Zellsuspension zur Untersuchung auf Objektträger auftragen. Es muss darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht hin- und herbewegt werden.

C. Vorbereitung der Objektträger

- Schritt 1** Die Objektträger müssen vollkommen sauber sein. Ein geeignetes Reinigungsverfahren besteht darin, die Objektträger über Nacht in Chromsäure einzuweichen, wonach sie mindestens eine halbe Stunde lang unter fließendem Wasser gespült und mit einem Gläsetuch poliert werden sollen.
- Schritt 2** 1 bis 2 Tropfen resuspendiertes Zellpräparat in die Mitte eines Glas-Objektträgers auftragen und ausbreiten lassen.
- Schritt 3** Überschüssiges Fixiermittel mit Filterpapier von den Rändern des Objektträgers abwischen.
- Schritt 4** Sobald die ersten Newton-Ringe erscheinen, vorsichtig blasen, damit der Objektträger in der Endphase schneller trocknet.
- Schritt 5** Mit Giemsa oder 2% Essigsäure-Orzein färben und fixieren.

Fixierte, gefärbte und eingebettete Objektträger sind bei richtiger Lagerung unbegrenzt haltbar. Durch Scannen mit schwacher Vergrößerung, Ablesen mit starker Vergrößerung und anschließende Mikrophotographie werden letztendlich Karyogramme erstellt, die bis ins Detail untersucht und mit Fallberichten abgelegt werden können.

ERGEBNISSE

QUALITÄTSKONTROLLE

Einige Faktoren, darunter Ursprung der Probe, Kulturbedingungen und Auswahl der Reagenzien können das Ergebnis beeinflussen. Es wird empfohlen, mit jeder neuen Reagenziencharge parallel Referenzmaterial mit bekannter, geeigneter Aktivität zu testen, bevor die Charge für Routintests verwendet wird.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Der genaue Mechanismus der Lymphozytentransformation ist noch nicht vollständig erforscht; daher kommt es manchmal zu unerklärlichen technischen Fehlern. Da Serumfaktoren bisher nicht identifiziert sind, können sie zu Interferenzen führen, doch bleibt eine mikrobielle Kontamination der Zellkultursysteme die häufigste Fehlerquelle. Daher muss das Verfahren für Lymphozytenkultursysteme genauestens befolgt werden, wenn sie regelmäßig erfolgreich sein sollen. Optimale Ergebnisse hängen sowohl von der Auswahl der Kulturbedingungen als auch der Reagenzien ab, die einen guten Mitoseindex liefern. Daher sind auch das Screening von Serumzusätzen vor Gebrauch, die Titrierung von PHA und die Kenntnis der Patientenvorgeschichte und deren Auswirkungen auf die Lymphozytenreaktion nützlich.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Die modale Chromosomenzahl des Menschen beträgt 46. Humane Chromosomen sind nach Größe und Zentromerposition in Gruppen eingeteilt worden (Denver-Klassifikation⁷). Chromosomenaberrationen stehen im Zusammenhang mit einer Reihe kongenitaler Krankheiten, wie z. B. Down-Syndrom (typischerweise mit einem zusätzlichen kleinen Autosom) und Syndromen, die mit unbestimmter Sexualität verbunden sind (Turner-Syndrom, Klinefelter-Syndrom und andere Syndrome mit Anomalien der Geschlechtschromosomen). Eine erworbene Chromosomenanomalie kann im Falle einer chronischen myeloischen Leukämie in einem Teil der Leukozyten (Philadelphia-Chromosom) nachgewiesen werden, und der Behandlungsfortschritt kann anhand dieses Markers mitverfolgt werden. Wenn die Toleranzgrenze bei einer Strahlentherapie erreicht ist, kommt es zu einer deutlichen Zunahme des Anteils an Zellen mit seltamer Chromosomenstruktur. Das Erscheinen dieser Zellen wurde bisher als Dosierungsrichtlinie verwendet.







LITERATUR

- ¹ **Arakaki, D.T. and Sparkes, R.S.** (1963). Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics*, 2, 57-60.
- ² **Li, J.G. and Osgood, E.E.** (1949). A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with a phytohemagglutinin from red beans (*Phaseolus vulgaris*). *Blood*, 4, 670.
- ³ **Maluish, A.E. and Strong, D.M.** (1986). Lymphocyte proliferation. *In* Manual of Clinical Laboratory Immunology, pp. 274-281, 3rd Edition. Eds. N.R. Rose, H. Friedman and J.L. Fahey. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- ⁴ **Nowell, P.C.** (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, 20, 462-466.
- ⁵ **Waite, W.I. and Hirschorn, K.** (1978). Lymphocyte response to activators. *In* Handbook of Experimental Immunology, 3rd Edition, D.M. Weir, Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Chapter 26-Lymphocyte response to activators.
- ⁶ **Watt, J.L. and Stephen, G.S.** (1986). Lymphocyte culture for chromosome analysis. *In* Human Cytogenetics: a practical approach, pp. 39-55. Eds. D.E. Rooney and B.H. Czepulkowski, IRL Press Ltd., Oxford.
- ⁷ A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. (1960). *Lancet*, 1, 1063.

VERPACKUNG

REF HA15/R30852701.....5 ml

Legende

	Katalognummer
	In der Packungsbeilage (IFU) nachlesen
	Temperatureinschränkungen (Lagertemperatur)
	Chargencode (Lotnummer)
	„Verwendbar bis“ (Verfallsdatum)
	Hersteller

IFU X7813 überarbeitet November 2011

 Remel Europe Ltd, Clipper Boulevard West,
Crossways, Dartford, Kent, DA2 6PT, UK

Bei technischen Fragen wenden Sie sich bitte an Ihren
zuständigen Vertriebspartner.