

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37

Code No./ Code/ Code-Nr. C 7224 APC-Conjugated
Code No./ Code/ Code-Nr. F 0768 FITC-Conjugated
Code No./ Code/ Code-Nr. R 0808 RPE-Conjugated
Code No./ Code/ Code Nr. C 7066 RPE-Cy5-Conjugated

ENGLISH

Intended use For in vitro diagnostic use.
 C 7224, F 0768, R 0808 and C 7066 are intended for use in flow cytometry. CD19 is the broadest lineage-specific surface marker for B cells and it is present on the surface of virtually all B lymphocytes, including early B progenitor cells (1). CD19 expression is maintained in B-lineage cells that have undergone neoplastic transformation (2). Antibodies to CD19 are considered essential for the initial evaluation of acute and chronic lymphoproliferative disorders (3). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Introduction CD19 is a 120 kDa transmembrane glycoprotein with a reduced Mr of 95 000 (2, 4). CD19 is a member of the immunoglobulin superfamily with two extracellular C2-type domains (2), and it is a critical signal transduction molecule that regulates B lymphocyte development, activation, and differentiation (4). CD19 expression is restricted to normal and neoplastic B cells, being absent from T cells, monocytes, and granulocytes (2). The CD19 antigen appears early during B cell maturation, probably at late pro-B cell stage around the time of Ig heavy chain rearrangement. It then persists during all stages of B cell maturation and is lost upon terminal differentiation to plasma cells (2). The advantage of immunodetection of CD19 expression is that B lineage leukaemias and lymphomas rarely lose the epitope (5). Expression of CD19 in some acute myelocytic leukaemia cells has been described (2).

Reagent provided The Anti-CD19 conjugates, C 7224, F 0768, R 0808, and C 7066, have been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).

Isotype: IgG1, kappa. **Conjugate concentration mg/L:** see label on vial.

Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Code No.	Control
F 0768	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927	
R 0808	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928	
C 7066	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanine 5)	X 0955	
C 7224	APC (Allophycocyanin)	X 0968	

Immunogen Hairy cell leukaemia cells (6).

Specificity Anti-CD19, HD37, was included in the Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with CD19 (7, 8).

Anti-CD19, HD37, labels human B cells in peripheral blood, bone marrow and other tissues. Additionally, B-cell lymphoproliferative disorders gave positive reactions with the antibody, i.e. acute lymphoblastic leukaemia, chronic lymphocytic leukaemia, hairy cell leukaemia, lymphoblastic lymphoma (Burkitt type), centroblastic/centrocytic lymphoma, and diffuse non-Hodgkin's lymphoma. The antibody was shown to be unreactive with other cells in the human haematopoietic system and did not react with non-haematopoietic cells, e.g. in kidney, liver, breast or lung tissues (8). Anti-CD19, HD37, inhibits anti-Ig-induced B-cell activation and proliferation (1).

Precautions 1. For professional users.
 2. 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.
 3. 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. 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.

Staining procedure 1. Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.
 2. Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6.
 3. Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4.
 4. Mix 100 µL cell suspension with 10 µL of the fluorochrome-conjugated Anti-CD19.
 5. Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
 6. Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.
 7. Wash twice with PBS containing 2% BSA. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
 8. 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.

Product-specific limitations It has been observed that RPE-Cy5-conjugates may bind to monocytes, resulting in background staining (9).

(103444-001) C 7224/F 0768/R 0808/C 7066/EFG/KIM/01.07.02 p. 1/4

FRANÇAIS

Intérêt Pour diagnostic *in vitro*.
 Les anticorps C 7224, F 0768, R 0808 et C 7066 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. Le CD19 est le marqueur de surface spécifique le plus général de la lignée cellulaire B, il est quasiment présent à la surface de tous les lymphocytes B, y compris les cellules souches B précoces (1). L'expression du CD19 est conservée dans les cellules de la lignée B ayant subi une transformation néoplasique (2). Les anticorps dirigés contre le CD19 sont considérés comme essentiels lors de l'évaluation initiale des troubles lymphoprolifératifs aigus et chroniques (3). 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 Le CD19 est une glycoprotéine transmembranaire de 120 kDa, dont le Mr, réduit, est de 95 000 (2, 4). Le CD19 est une glycoprotéine transmembranaire de 120 kDa, dont le Mr, réduit, est de 95 000 (2, 4). Le CD19 est membre de la superfamille des immunoglobulines dotées de deux domaines extracellulaires de type C-2 (2), c'est une molécule critique de la transduction des signaux qui régule le développement, l'activation et la différenciation des lymphocytes B (4). L'expression du CD19 est restreinte aux cellules B normales et néoplasiques, elle est absente des cellules T, des monocytes et des granulocytes (2). L'antigène CD19 apparaît précocement au cours de la maturation des cellules B, probablement au cours du dernier stade pro-B lors du réarrangement de la chaîne lourde des Ig. Il persiste alors pendant toutes les étapes de la maturation des cellules B et il n'est perdu qu'à la différenciation terminale en cellules plasmiques (2). L'avantage de l'immunodétection de l'expression du CD19 réside dans le fait que les lymphomes et leucémies de la lignée B perdent rarement l'épitope (5). L'expression du CD19 dans certaines cellules des leucémies myélocytaires aiguës a été décrite (2).

Réactif fourni Les conjugués anti-CD19, C 7224, F 0768, R 0808 et C 7066, ont été obtenus à partir d'un anticorps monoclonal purifié de souris. Les conjugués sont fournis sous forme liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/l de NaN₃, à 7,2 de pH. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 µl de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10⁶ de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain)

Isotype: IgG1, kappa. **Concentration du conjugué mg/l:** Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Code de l' anticorps	Fluor	Code du Contrôle Négatif
F 0768	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927
R 0808	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928
C 7066	RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine-Cyanine 5)	X 0955
C 7224	APC (Allophycocyanine)	X 0968

Immunogène Cellules des leucémies à tricholeucocytes (6).

Spécificité Le HD37, anti-CD19, a été intégré au cours des "2th, 3rd, 4th and 5th International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens", et les études réalisées par de nombreux laboratoires ont confirmé sa réactivité vis-à-vis du CD19 (7, 8).

Le HD37, anti-CD19, marque les cellules B humaines du sang périphérique, de la moelle osseuse et d'autres tissus. De plus, les troubles lymphoprolifératifs à cellules B conduisent à des réactions positives avec l'anticorps, par exemple en cas de leucémie lymphoblastique aiguë, de leucémie lymphoïde chronique, de leucémie à tricholeucocytes, de lymphome lymphoblastique (de type Burkitt), de lymphome centroblastique/centrocytique et de lymphome non hodgkinien diffus. Il a été montré que l'anticorps n'était pas réactif avec d'autres cellules du système hématopoïétique humain et ne réagissait pas avec les cellules non hématopoïétiques, par exemple les cellules du tissu rénal, hépatique, mammaire ou pulmonaire (8). Le HD37, anti-CD19, inhibe l'activation et la prolifération des cellules B induite par les anti-Ig (1).

Précautions d'emploi 1. Pour utilisateurs professionnels.
 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique extrêmement 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.

Stockage Conserver à l'obscurité entre 2° et 8 °C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption mentionnée sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans d'autres conditions que celles qui sont préconisées, 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. 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.

Procédure d'immunomarquage 1. Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.
 2. Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6.
 3. Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH.
 4. Mélanger 100 µl de la suspension de cellules avec 10 µl de conjugué fluorochrome Anti-CD19.
 5. Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).
 6. Laisser incuber à l'obscurité, à 4 °C, pendant 30 minutes.
 7. Laver deux fois avec du PBS contenant 2% de BSA. Remettre les cellules en suspension dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 ml de paraformaldéhyde (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/l, à pH 7,4.
 8. Analyser sur un cytomètre en flux.

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

Limitations spécifiques du produit Il a été observé que les conjugués RPE-Cy5 pouvaient se lier aux monocytes, ce qui se traduit par un marquage qui n'est pas spécifique (9).

(103444-001) C 7224/F 0768/R 0808/C 7066/EFG/KIM/01.07.02 p. 2/4

DEUTSCH

Zweckbestimmung Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

C 7224, F 0768, R 0808 und C 7066 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. CD19 ist der am weitesten verbreitete abstammungsspezifische Marker für B-Zellen und ist auf der Oberfläche praktisch aller B-Lymphozyten, einschließlich früher B-Vorläuferzellen, vorhanden (1). Die CD19-Expression bleibt auch bei Zellen der B-Zelllinie aufrechterhalten, die eine neoplastische Transformation durchlaufen haben (2). Antikörper gegen CD19 werden als ausschlaggebend für die anfängliche Beurteilung von akuten und chronischen lymphoproliferativen Entgleisungen angesehen (3). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem erfahrenen Pathologen interpretiert werden.

Einleitung CD19 ist ein 120 kDa Transmembran-Glykoprotein mit reduzierter relativer Molekülmasse von 95 000 (2, 4). CD19 gehört zur Superfamilie der Immunglobuline mit zwei extrazellulären Domänen vom Typ C2 (2) und ist ein ausschlaggebendes Signaltransduktionsmolekül, das die Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung der B-Lymphozyten reguliert (4). Die Expression von CD19 ist auf normale und neoplastische B-Zellen begrenzt und fehlt in T-Zellen, Monozyten und Granulozyten (2). Das CD19-Antigen erscheint frühzeitig während des B-Zellreifungsprozesses, wahrscheinlich im späten pro-B-Zellstadium, etwa zur Zeit des Rearrangement der Ig-Schwerkette. Es bleibt dann während aller Stadien der B-Zellreifung erhalten und geht bei der endgültigen Differenzierung zu Plasmazellen verloren (2). Der Vorteil des immunologischen Nachweises der CD19-Expression liegt darin, dass Leukämien der B-Zelllinie und Lymphome nur selten das Epitop verlieren (5). Die Expression von CD19 wurde in manchen Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) beschrieben (2).

Geliefertes Reagenz Die Anti-CD19-Konjugate C7224, F 0768, R 0808 und C 7066, stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L Na₂S₂O₃, 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).

Isotyp: IgG1, Kappa. **Konjugat-Konzentration mg/L:** Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.
F 0768	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927
R 0808	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
C 7066	RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Zyanin 5)	X 0955
C 7224	APC (Allophycocyanin)	X 0968

Immunogen Haarzell-Leukämie-Zellen (6).

Spezifität Anti-CD19, HD37, wurde im Kontext der „aufgenommen und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit CD19 (7, 8). Anti-CD19, HD37, markiert menschliche B-Zellen im peripheren Blut, im Knochenmark und in anderen Geweben. Außerdem erbrachten lymphoproliferative Entgleisungen der B-Zellen positive Reaktionen mit dem Antikörper, wie z. B. Akute Lymphatische Leukämie (ALL), Chronische Lymphatische Leukämie, Haarzell-Leukämie, Lymphoblastisches Lymphom (vom Burkitt-Typ), zentroblastisches-zentrozytisches Lymphom und diffuses Non-Hodgkin Lymphom. Der Antikörper reagierte nicht mit anderen Zellen des menschlichen hämatopoetischen Systems und reagierte nicht mit nicht hämatopoetischen Zellen, z. B. des Nieren-, Leber-, Brust- oder Lungengewebes (8). Anti-CD19, HD37, hemmt die anti-Ig-induzierte Aktivierung und Proliferation der B-Zellen (1).

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. Falls die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt werden, 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. Wenn unerwartete Verfärbung 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.

Färbeprozedur

- Venöse Blutprobe in ein Probenröhrchen mit gerinnungshemmendem Mittel gewinnen.
- Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren auf einem Abtrennungsmittel isolieren. Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
- Die mononukleären Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2-7,4 waschen.
- 100 µL der Zellsuspension mit 10 µL des fluorochromkonjugierten Anti-CD19 mischen.
- Als Negativkontrolle einen nicht reaktiven, monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps, konjugiert an dasselbe Fluorochrom, verwenden (s. Tabelle).
- Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
- Zweimal mit PBS waschen, das 2 % BSA enthält. Die Zellen in einer für Durchflusszytometrie geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 1%igem 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 Fluorochromkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während der Färbeprozedur und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

Produktspezifische Beschränkungen Die Bindung von RPE-Cy5-Konjugaten an Monozyten wurde beschrieben, wodurch eine Hintergrundfärbung möglich ist (9).

References/ Références/ Literatur

- Pezzutto A, Dörken B, Rabinovitch PS, Ledbetter JA, Moldenhauer G, Clark EA. CD19 monoclonal antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. J Immunol 1987;138:2793-9.
- Sato S, Tedder TF. BC3. CD19 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 133-5.
- Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001;46:23-7.
- Sato S, Tedder TF. CD guide. CD19. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 764-5.
- Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. London: Oxford University Press; 1999. p. 67-8.
- Pezzutto A, Dörken B, Feller A, Moldenhauer G, Schwartz R, Wernet P, et al. HD37 monoclonal antibody: a useful reagent for further characterization of "non-T, non-B" lymphoid malignancies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. Leucocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume 2. p. 391-402.
- Nadler LM. B cell/leukemia panel workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. Leucocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume 2. p. 3-43.
- Mason DY, Ladyman H, Gatter KC. Immunohistochemical analysis of monoclonal anti-B cell antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. Leucocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume 2. p. 245-55.
- van Vugt MJ, van den Herik-Oudijk IE, van de Winkel JGJ. Binding of PE-CY5 conjugates to the human high-affinity receptor for IgG (CD64). Blood 1996;88:2358-61.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 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)	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	