

Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone DK25

Code No./ Code/ Code-Nr. **C 7227 APC-Conjugated**
 Code No./ Code/ Code-Nr. **F 0765 FITC-Conjugated**
 Code No./ Code/ Code-Nr. **R 0806 RPE-Conjugated**
 Code No./ Code/ Code-Nr. **C 7079 RPE-Cy5-Conjugated**

| ENGLISH | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---------------------------|--------------|---------------------------|--------|--|--------|--------|-----------------------|--------|--------|-------------------------------------|--------|--------|-----------------------|--------|
| Intended use | For in vitro diagnostic use. C 7227, F 0765, R 0806 and C 7079 are intended for use in flow cytometry. Measurement of the relative as well as the absolute number of CD8-positive cells in peripheral blood is critically important in assessing the immunological status of a patient (1). Additionally, CD8 has an important role in the immunophenotypic analysis of reactive and neoplastic populations of T cells (2). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Introduction | CD8 is a 68 kDa disulphide-linked, transmembrane glycoprotein. The CD8 molecule serves as a receptor for MHC class I molecules and can mediate a function as a coreceptor in TCR-ligand binding and T-cell activation. Its cytoplasmic part is associated with the p56 ^{lck} tyrosine kinase (1). CD8 is expressed by the great majority of cortical thymocytes and approximately 30% of medullary thymocytes, and by class I major histocompatibility complex restricted, mature suppressor/cytotoxic T cells. In addition a proportion of $\gamma\delta$ T cells and NK cells express CD8 (1). Thus, CD8 is expressed by about 25-35% of peripheral T cells, and about 30% of NK cells express low levels of CD8 (2). Immunophenotyping of lymphocytes is widely applied as a component of the testing of peripheral blood for diagnosis of immunodeficiencies such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (3, 4). An increase in the percentage of CD8-positive T cells has been reported during cytomegalovirus infection (5). | | | | | | | | | | | | | | | |
| Reagent provided | The Anti-CD8 conjugates, C 7227, F 0765, R 0806 and C 7079, 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 NaN ₃ , pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 μ L of conjugate for up to 10 ⁶ leucocytes from normal peripheral blood). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Conjugate concentration mg/L:</u> see label on vial. | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Antibody Code No.</th> <th>Fluorochrome</th> <th>Negative Control Code No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F 0765</td> <td>FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)</td> <td>X 0927</td> </tr> <tr> <td>R 0806</td> <td>RPE (R-Phycoerythrin)</td> <td>X 0928</td> </tr> <tr> <td>C 7079</td> <td>RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanine 5)</td> <td>X 0955</td> </tr> <tr> <td>C 7227</td> <td>APC (Allophycocyanin)</td> <td>X 0968</td> </tr> </tbody> </table> | Antibody Code No. | Fluorochrome | Negative Control Code No. | F 0765 | FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1) | X 0927 | R 0806 | RPE (R-Phycoerythrin) | X 0928 | C 7079 | RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanine 5) | X 0955 | C 7227 | APC (Allophycocyanin) | X 0968 |
| Antibody Code No. | Fluorochrome | Negative Control Code No. | | | | | | | | | | | | | | |
| F 0765 | FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1) | X 0927 | | | | | | | | | | | | | | |
| R 0806 | RPE (R-Phycoerythrin) | X 0928 | | | | | | | | | | | | | | |
| C 7079 | RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanine 5) | X 0955 | | | | | | | | | | | | | | |
| C 7227 | APC (Allophycocyanin) | X 0968 | | | | | | | | | | | | | | |
| Specificity | The specificity of Anti-CD8, DK25, is equivalent to that of the CD8-clustered antibodies OKT8 and Leu-2a (6). | | | | | | | | | | | | | | | |
| Precautions | <ol style="list-style-type: none"> 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. 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 | <ol style="list-style-type: none"> Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant. Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6. Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4. Mix 100 μL cell suspension with 10 μL of the fluorochrome-conjugated Anti-CD8. Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table). Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes. 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. Analyse on a flow cytometer. | | | | | | | | | | | | | | | |

Product-specific limitations It has been observed that RPE-Cy5-conjugates may bind to monocytes, resulting in background staining (7).

| FRANÇAIS | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--|------------------------------------|--------------|------------------------------------|--------|---|--------|--------|------------------------|--------|--------|--------------------------------------|--------|--------|------------------------|--------|
| Intérêt | Pour diagnostic in vitro. C 7227, F 0765, R 0806 et C 7079 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. Les mesures, relative et absolue, des cellules CD8-positives dans le sang périphérique revêtent une importance critique au cours de l'évaluation du statut immunologique d'un patient (1). De plus, CD8 a un rôle important dans l'analyse immunophénotypique des populations réactives et néoplasiques des cellules T (2). 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 | CD8 est une glycoprotéine transmembranaire 68 kDa liées par ponts disulfures. La molécule CD8 sert de récepteur pour les molécules MHC classe I et peut assurer la médiation comme corécepteur dans les affinités de liaisons TCR-ligand et l'activation des cellules T. Sa partie cytoplasmique est associée avec la tyrosine kinase p56 ^{lck} (1). CD8 est exprimée par une grande partie des thymocytes corticales et environ 30% des thymocytes médullaires, et par les cellules T suppressives/cytotoxiques classe I majeures de complexe d'histocompatibilité limité. De plus, un certain nombre de cellules $\gamma\delta$ T et de cellules NK expriment le CD8 (1). Par conséquent, CD8 est exprimé par 25 à 35% environ des cellules T périphériques, et 30% environ des cellules NK expriment de faibles niveaux de CD8 (2). L'immunophénotypage des lymphocytes est un élément largement utilisé de l'analyse du sang périphérique en vue du diagnostic des immunodéficiences comme le syndrome d'immunodéficiência acquise (SIDA) (3, 4). Une augmentation du pourcentage des cellules T positives au CD8 a été reportée durant l'infection de cytomegalovirus (5). | | | | | | | | | | | | | | | |
| Réactif fourni | Les conjugués anti-CD38, C 7227, F 0765, R 0806 et C 7079, ont été obtenus à partir d'un anticorps monoclonal purifié de souris. Les conjugués sont fournis à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/L de NaN ₃ , à 7,2 de pH. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 μ l de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10 ⁶ de leucocytes provenant de sang périphérique normal). <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Concentration du conjugué mg/L:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon. | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Numéro du code de l'anticorps</th> <th>Fluorochrome</th> <th>Numéro du code du contrôle négatif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F 0765</td> <td>FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)</td> <td>X 0927</td> </tr> <tr> <td>R 0806</td> <td>RPE (R-Phycoérythrine)</td> <td>X 0928</td> </tr> <tr> <td>C 7079</td> <td>RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine-Cyanine 5)</td> <td>X 0955</td> </tr> <tr> <td>C 7227</td> <td>APC (Allophycocyanine)</td> <td>X 0968</td> </tr> </tbody> </table> | Numéro du code de l'anticorps | Fluorochrome | Numéro du code du contrôle négatif | F 0765 | FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine) | X 0927 | R 0806 | RPE (R-Phycoérythrine) | X 0928 | C 7079 | RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine-Cyanine 5) | X 0955 | C 7227 | APC (Allophycocyanine) | X 0968 |
| Numéro du code de l'anticorps | Fluorochrome | Numéro du code du contrôle négatif | | | | | | | | | | | | | | |
| F 0765 | FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine) | X 0927 | | | | | | | | | | | | | | |
| R 0806 | RPE (R-Phycoérythrine) | X 0928 | | | | | | | | | | | | | | |
| C 7079 | RPE-Cy5 (R-Phycoérythrine-Cyanine 5) | X 0955 | | | | | | | | | | | | | | |
| C 7227 | APC (Allophycocyanine) | X 0968 | | | | | | | | | | | | | | |
| Spécificité | La spécificité de l'Anti-CD8, DK25, est équivalente aux anticorps groupés CD8, OKT8 et Leu-2a (6). | | | | | | | | | | | | | | | |
| Précautions d'emploi | <ol style="list-style-type: none"> Pour utilisateurs professionnels. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit 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. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Conservation | Conserver 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. 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 | <ol style="list-style-type: none"> Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant. Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6. Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH. Mélanger 100 μL de la suspension de cellules avec 10 μl de conjugué fluorochrome Anti-CD8. Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau). Laisser incubé à l'obscurité, à 4 °C, pendant 30 minutes. 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. Analyser sur un cytomètre en flux. | | | | | | | | | | | | | | | |

Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif appropriés à chacune des exécutions pour le contrôle du réactif et de la préparation. Remarquer que les conjugués fluorochromes sont photosensibles, les échantillons doivent donc être protégés de la lumière pendant la procédure d'immunomarquage 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 (7).

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

C 7227, F 0765, R 0806 und C 7079 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. Die Bestimmung sowohl der relativen als auch der absoluten Zahl CD8-positiver Zellen im peripheren Blut ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Einschätzung des immunologischen Status eines Patienten (1). Außerdem kommt CD8 eine wichtige Rolle in der immunophänotypischen Analyse der reaktiven und neoplastischen Population der T-Zellen zu (2). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem erfahrenen Pathologen interpretiert werden.

Einleitung

CD8 ist ein Disulfid-vernetztes Transmembran-Glykoprotein von 68 kDa. Das CD8 Molekül dient als Rezeptor für MHC-Moleküle der Klasse I und kann als Korezeptor bei der TCR-Ligandenbindung und T-Zell-Aktivierung dienen. Sein zytoplasmatischer Teil ist mit der p56^{lck} Tyrosin-Kinase assoziiert (1).

CD8 wird von der großen Mehrzahl der kortikalen Thymozyten und von etwa 30% der medullären Thymozyten, sowie von auf den Histokompatibilitätshauptkomplex der Klasse I beschränkten reifen Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellen exprimiert. Überdies wird CD8 von einem Teil der $\gamma\delta$ T Zellen und NK Zellen exprimiert (1). CD8 wird somit von ungefähr 25–35% der peripheren T-Zellen und von etwa 30% der NK-Zellen in mindere Ausmaß exprimiert (2).

Immunophänotypisierung der Lymphozyten ist eine sehr gebräuchliche Methode der diagnostischen Testung von peripherem Blut, wie etwa beim erworbenen Immundefekt-Syndrom (AIDS) (3, 4). Eine prozentuelle Zunahme der CD8-positiven T-Zellen wurde während der Dauer der Zytomegalie-Infektion beschrieben (5).

Geliefertes Reagenz

Die Anti-CD8 Konjugate C 7227, F 0765, R 0806 und C 7079 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 für 100 Tests ausreichend (10 μ L des Konjugats für bis 10⁶ Leukozyten aus normalem peripherem Blut).

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

| Antikörper Code-Nr. | Fluorochrom | Negativkontrolle Code-Nr. |
|---------------------|--|---------------------------|
| F 0765 | FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1) | X 0927 |
| R 0806 | RPE (R-Phycoerythrin) | X 0928 |
| C 7079 | RPE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Zyanin 5) | X 0955 |
| C 7227 | APC (Allophycocyanin) | X 0968 |

Spezifität

Die Spezifität von Anti-CD8, DK25 ist derjenigen von CD8-Antikörpergruppe OKT8 und Leu-2a (6) äquivalent.

Hinweise und

Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na₂N₃), 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. 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.

Färbeprozedur

- Venöses Blut in ein Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
- Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren in einem Abtrennungsmittel isolieren. Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
- Mononukleäre Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2 – 7,4, waschen.
- 100 μ L der Zellsuspension mit 10 μ L des fluorochromkonjugierten Anti-CD8 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 0,01mol/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 Färbeprogangs 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 (7).

References/ Références/ Literatur

- Nakauchi H. TC9. CD8 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. 65-7.
- Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. London: Oxford University Press; 1999. p. 55-6.
- Watret KC, Whitelaw JA, Froebel KS, Bird AG. Phenotypic characterization of CD8+ T cell populations in HIV disease and in anti-HIV immunity. Clin Exp Immunol 1993;92:93-9.
- Hengel RL, Nicholson JK. An update on the use of flow cytometry in HIV infection and AIDS. Clin Lab Med 2001;21:841-56.
- Collier AC, Meyers JD, Corey L, Murphy VL, Roberts PL, Handsfield HH. Cytomegalovirus infection in homosexual men. Relationship to sexual practices, antibody to human immunodeficiency virus, and cell-mediated immunity. Am J Med 1987;82:593-601.
- Stein H, Lennert K, Feller AC, Mason DY. Immunohistological analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunological categories. Adv Cancer Res 1984;42:67-147.
- 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 |  2°C – 8°C 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 | |