

**Polyclonal Rabbit  
Anti-Human  
Lysozyme EC 3.2.1.17/FITC  
Code No./ Code/ Code-Nr. F 0372**

**ENGLISH**

<b>Intended use</b>	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>F 0372, Polyclonal Rabbit Anti-Human Lysozyme EC 3.2.1.17/FITC, is intended for use in flow cytometry. F 0372 has been optimized for the labelling of intracellular lysozyme when used in combination with the Dako IntraStain Fixation and Permeabilization Kit, code No. K 2311. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.</p>
<b>Introduction</b>	<p>Lysozyme, originally identified and named by Alexander Fleming in 1922 and defined as a bacteriolytic tissue element, is ubiquitous in its distribution among living organisms and has in humans been demonstrated in several organs and tissue fluids (1). Within the haematopoietic system, lysozyme is known as an intracellular pan-myeloid marker molecule that is selectively expressed by cells of the granulo-monocytic lineage. Normal monocytic precursors seem first to synthesize lysozyme and then later on myeloperoxidase, whereas myeloperoxidase synthesis seems to precede lysozyme in neutrophil development thus mirroring the expression pattern in acute myeloid leukaemia (AML). Mature monocytes are thought to continuously synthesize and secrete lysozyme while granulocytes do not synthesize but only secrete the preformed enzyme (2).</p>
<b>Reagent provided</b>	<p>F 0372 is the purified immunoglobulin fraction of rabbit antiserum conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC). The conjugate is 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 µL of conjugate for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood).</p> <p><u>Immunoglobulin concentration g/L:</u> See label on vial.</p> <p><u>F/P ratio:</u> E<sub>495 nm</sub>/E<sub>278 nm</sub> = 1.00 ± 0.15 corresponding to a molar FITC/protein ratio of 4.</p>
<b>Immunogen</b>	<p>Lysozyme isolated from urine of patients with monocytic leukaemia.</p>
<b>Specificity</b>	<p>The antibody reacts with human lysozyme. Traces of contaminating antibodies have been removed by solid-phase absorption with human plasma and urine proteins.</p> <p>The specificity has been ascertained as follows:</p> <p><u>Crossed immunoelectrophoresis:</u> Only the lysozyme precipitation arch appears when using 12.5 µL unconjugated antibody per square cm gel area against 2 µL of concentrated urine from patients with monocytic leukaemia. No precipitation arch is seen when the antibody is tested against 2 µL normal human plasma or 2 µL concentrated normal human urine. Staining: Coomassie Brilliant Blue.</p> <p>In immunocytochemistry the antibody labels the cytoplasm in polymorphs and monocytes but rarely in lymphocytes (3). The antibody has been recommended as part of a panel of antibodies for the immunophenotyping of acute leukaemia in bone marrow biopsy specimens as it aids in the differentiation of AML from acute lymphoblastic leukaemia (ALL) (4). The International Lymphoma Study Group (ILSG) recommends the antibody as part of a panel of antibodies for the immunocytochemical immunophenotyping of histiocytic and dendritic cell neoplasms (5).</p>
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. For professional users.</li> <li>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.</li> <li>3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li> </ol>
<b>Storage</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
<b>Staining procedure</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transfer 50 µL (up to 10<sup>6</sup> cells) of the cell suspension to be analysed (whole blood or bone marrow) to a test tube.</li> <li>2. Add 100 µL Dako IntraStain Reagent A (Fixation), code No. K 2311. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension.</li> <li>3. Incubate at room temperature for 15 minutes.</li> <li>4. Add 2 mL PBS and mix gently by using a vortex mixer.</li> <li>5. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid.</li> <li>6. Mix thoroughly by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension and add 100 µL Dako IntraStain Reagent B (Permeabilization), code No. K 2311. Add 10 µL of F 0372. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension.</li> <li>7. Use a non-reactive polyclonal rabbit antibody conjugated with FITC as a negative control.</li> </ol>

8. Incubate in the dark at room temperature for 15 minutes.
9. Repeat steps 4 and 5.
10. Resuspend the pellet in an appropriate fluid for flow cytometric analysis, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
11. 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

<b>Intérêt</b>	<p>Pour diagnostic in vitro.</p> <p>L'anticorps polyclonal de lapin anti-lysozyme humain EC 3.2.1.17/FITC, code F 0372, est destiné à la cytométrie en flux. L'anticorps F 0372 a été optimisé pour le marquage du lysozyme intracellulaire en association avec la trousse Dako IntraStain Fixation and Permeabilization, code K 2311. L'interprétation des résultats doit être réalisée uniquement par un professionnel agréé dans le contexte de l'historique du patient et d'autres examens.</p>
<b>Introduction</b>	<p>Le lysozyme, qui a été identifié et dénommé par Alexander Fleming en 1922, et défini comme un élément tissulaire bactériolytique, possède une distribution ubiquitaire parmi les organismes vivants et a été mis en évidence dans de nombreux organes et liquides tissulaires chez l'être humain (1). Au niveau du système hématopoïétique, le lysozyme est considéré comme un marqueur moléculaire intracellulaire pan-myéloïde exprimé spécifiquement par les cellules de la lignée granulo-monocytaire. Les précurseurs monocytaires normaux semblent synthétiser tout d'abord le lysozyme puis plus tard la myéloperoxydase, alors que cette dernière synthèse semble précéder celle du lysozyme au cours du développement des neutrophiles reflétant ainsi le profil d'expression lors des leucémies myéloblastiques aiguës (LMA). Les monocytes synthétisent et sécrètent en permanence le lysozyme alors que les granulocytes ne le synthétisent pas ; ils ne font que sécréter l'enzyme préformée (2).</p>
<b>Réactif fourni</b>	<p>Le F 0372 est constitué par une fraction immunoglobulinique purifiée d'antisérum de lapin conjuguée à l'isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le conjugué est fourni sous forme liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub>, à pH 7,2. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10<sup>6</sup> de leucocytes provenant de sang humain périphérique normal)</p> <p><u>Concentration en immunoglobulines g/L:</u> Se reporter à l'étiquette sur le flacon.</p> <p><u>Rapport F/P:</u> E<sub>495 nm</sub>/E<sub>278 nm</sub> = 1,00 ± 0,15 correspondant à un rapport molaire FITC/protéine de 4.</p>
<b>Immunogène</b>	Lysozyme isolé à partir d'urine de patients atteints de leucémie monocyttaire.
<b>Spécificité</b>	<p>L'anticorps réagit avec le lysozyme humain. Les traces d'anticorps contaminants ont été éliminées par adsorption sur phase solide avec des protéines plasmatiques et urinaires humaines.</p> <p>La spécificité a été vérifiée comme décrit ci-dessous.</p> <p><u>Immunoélectrophorèse croisée:</u> Seul l'arc de précipitation du lysozyme apparaît lors de l'utilisation de 12,5 µL d'anticorps non conjugué par cm<sup>2</sup> de gel contre 2 µL d'urine concentrée provenant de patients atteints de leucémie monocyttaire. Aucun arc de précipitation n'a été observé lorsque l'anticorps a été testé contre 2 µL de plasma humain normal ou 2 µL d'urine humaine normale concentrée. Colorant : bleu de Coomassie brillant.</p> <p>En immunocytochimie, l'anticorps marque le cytoplasme des polymorphonucléaires et des monocytes, mais rarement celui des lymphocytes (3). L'emploi de cet anticorps est recommandé au sein d'un panel d'anticorps pour l'immunophénotypage des leucémies aiguës sur des spécimens de biopsies de moelle osseuse, dans le cadre de la différenciation entre la LMA et les leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) (4). Le International Lymphoma Study Group (ILSG) recommande l'emploi de cet anticorps au sein d'un panel d'anticorps pour l'immunophénotypage immunocytochimique des néoplasmes à cellules dendritiques ou histiocytiques (5).</p>
<b>Précautions d'emploi</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pour utilisateurs professionnels.</li> <li>2. Ce produit renferme de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), un agent chimique extrêmement toxique à l'état pur. Bien que n'étant pas classé comme dangereux aux concentrations présentes dans le produit, l'azide de sodium est susceptible de réagir avec les parties en cuivre et en plomb des tuyauteries pour former des azides métalliques extrêmement explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter l'accumulation d'azides métalliques dans les tuyauteries.</li> <li>3. Comme pour tout produit d'origine biologique, des mesures de prudence s'imposent.</li> </ol>
<b>Conservation</b>	<p>Conserver dans l'obscurité entre 2° et 8°C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs ont été conservés dans des conditions autres que celles qui sont préconisées, ces conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Aucun signe visible n'indique l'instabilité du produit. Par conséquent il faut utiliser des contrôles positifs et négatifs au cours de chaque technique.</p> <p>Les conjugués ne doivent pas être conservés sous forme diluée. Si un marquage non conforme est observé qui ne peut pas s'expliquer par des variations dans les procédures du laboratoire et si le réactif est défectueux, contactez nos services techniques.</p>
<b>Procédure d'immunomarquage</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transférer 50 µL (jusqu'à 10<sup>6</sup> de cellules) de la suspension cellulaire afin de les analyser (sang total ou moelle osseuse) dans un tube à essai.</li> <li>2. Ajouter 100 µL de réactif A Dako IntraStain (Fixation), code K 2311. Mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur vortex pour s'assurer que toutes les cellules sont en suspension.</li> <li>3. Laisser incubé pendant 15 minutes à température ambiante.</li> <li>4. Ajouter 2 mL de PBS et agiter délicatement à l'aide d'un mélangeur vortex.</li> <li>5. Centrifuger à 300 g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant et conserver environ 50 µL de liquide.</li> </ol>

6. Mélanger complètement à l'aide d'un mélangeur vortex pour s'assurer que toutes les cellules sont en suspension et ajouter 100 µL de réactif B Dako IntraStain (Perméabilisation), code S 2311. Ajouter 10 µL de F 0372. Mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur vortex pour s'assurer que toutes les cellules sont en suspension.
7. Utiliser un anticorps polyclonal de lapin non réactif, conjugué au FITC, comme contrôle négatif.
8. Laisser incuber dans l'obscurité, à température ambiante, pendant 15 minutes.
9. Répéter les étapes 4 et 5.
10. Remettre le culot cellulaire en suspension dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de paraformaldéhyde 1 % (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/L, à pH 7,4.
11. Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure des échantillons de contrôle positif et négatif fiables dans chaque analyse afin de contrôler les réactifs et la procédure de 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 de coloration et jusqu'à l'analyse.

## DEUTSCH

### Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

F 0372, Polyclonal Rabbit Anti-Human Lysozyme EC 3.2.1.17/FITC, ist zum Gebrauch in der Durchflusszytometrie bestimmt. F 0372 wurde für die Markierung intrazellulären Lysozyms beim Gebrauch in Verbindung mit dem Dako IntraStain Fixation and Permeabilization Kit, Code-Nr. K 2311 optimiert. Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

### Einleitung

Lysozym wurde ursprünglich 1922 von Alexander Fleming identifiziert und benannt und als ein bakteriolytisches Gewebeelement definiert. Es zeigt eine allgegenwärtige Verbreitung in lebenden Organismen und wurde in mehreren menschlichen Organen und Gewebeflüssigkeiten nachgewiesen (1). Innerhalb des hämatopoietischen Systems ist Lysozym als ein intrazelluläres pan-myeloides Markermolekül bekannt, das von Zellen der granulo-monozytischen Linie selektiv exprimiert wird. Es scheint, dass normale monozytische Vorläufer zuerst Lysozym und danach Myeloperoxidase synthetisieren, während die Myeloperoxidase-Synthese dem Lysozym in der neutrophilen Entwicklung vorherzuziehen scheint und somit das Expressionsmuster der akuten myeloiden Leukämie (AML) widerspiegelt. Es wird angenommen, dass ausgereifte Monozyten Lysozym kontinuierlich synthetisieren und sekretieren, während Granulozyten das vorgeformte Enzym nicht synthetisieren, sondern nur sekretieren (2).

### Geliefertes Reagenz

Bei F 0372 handelt es sich um die gereinigte Immunglobulinfraktion des mit Fluorescein-Isothiocyanat Isomer 1 (FITC) konjugierten Kaninchenantisera. Das Konjugat wird 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-Wert 7,2 geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 µL des Konjugats sind für bis 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Proteinkonzentration g/L: Siehe Produktetikett.

F/P-Quotient:  $E_{495\text{ nm}}/E_{278\text{ nm}} = 1,00 \pm 0,15$  entsprechend einem molaren FITC/Protein-Quotienten von 4.

### Immunogen

Aus dem Harn von Patienten mit Monozytenleukämie isoliertes Lysozym.

### Spezifität

Der Antikörper reagiert mit humanem Lysozym. Durch die Festphasenabsorption mit humanen Plasma- und Harnproteinen wurden Spuren verunreinigender Antikörper entfernt.

Die Spezifität wurde auf folgende Art und Weise erhoben:

Kreuzimmunelektrophorese: Bei Verwendung von 12,5 µL unkonjugiertem Antikörper per cm<sup>2</sup> Geffläche gegen 2 µL konzentrierten Harn von Patienten mit Monozytenleukämie erscheint nur die halbmondförmige Lysozym-Präzipitationslinie. Kein Präzipitationsbogen wird festgestellt, wenn der Antikörper gegen 2 µL normales humanes Plasma oder 2 µL konzentrierten normalen, humanen Harn getestet wird. Anfärben: Coomassie Brilliant Blue.

In der Immunzytochemie markiert der Antikörper das Zytoplasma in Polymorphen und Monozyten, jedoch nur selten in Lymphozyten (3). Der Antikörper wurde als Teil eines Antikörper-Panels bei der Immunphänotypisierung von akuter Leukämie in Knochenmarkbiopsieproben empfohlen, da er die Differenzierung zwischen AML und akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) unterstützt (4). Die International Lymphoma Study Group (ILSG) empfiehlt den Antikörper als Teil eines Antikörper-Panels für die immunzytochemische Immunphänotypisierung von histiozytischen und dendritischen Zellneoplasmen (5).

### Hinweise und

### Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na<sub>3</sub>N), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metallazid-Anreicherung zu vermeiden.

3. 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.

Konjugate sollten nicht in verdünnter Form gelagert 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










1. 50 µL (bis 10<sup>6</sup> Zellen) aus der zu untersuchenden Zellsuspension (Vollblut oder Knochenmark) in ein Probenröhrchen geben.
2. 100 µL Dako IntraStain, Reagent A (Fixation), Code-Nr. K 2311, hinzugeben. Mittels eines Vortex-Mischers sanft mischen, um die Zellen in der Suspension zu erhalten.
3. 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
4. 2 mL PBS zufügen und vorsichtig im Vortex-Mixer mischen.
5. 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren, dann den Überstand aspirieren, so dass ungefähr 50 µL Flüssigkeit zurückbleiben.
6. Mittels eines Vortex-Mischers gut mischen, um die Zellen in der Suspension zu erhalten, und 100 µL Dako IntraStain Reagent B (Permeabilization), Code-Nr. K 2311 hinzugeben. 10 µL F 0372 hinzugeben. Mittels eines Vortex-Mischers sanft mischen, um die Zellen in der Suspension zu erhalten.
7. Als Negativkontrolle einen nicht reaktiven, polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der mit FITC konjugiert ist, verwenden.
8. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubieren.
9. Schritte 4 und 5 wiederholen.
10. Das Zellpellet in einer für die Durchflusszytometrie-Analyse geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0,3 mL 1%igem Paraformaldehyd (Fixativ) in 0,01 mol/L PBS, pH-Wert 7,4, resuspendieren.
11. Im Durchflusszytometer analysieren.

Es wird empfohlen, für jede Durchführung eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle zur 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.

## References/ Références/ Literatur

1. Åström M, Bodin L, Hörnsten P, Wahlin A, Tidefelt U. Evidence for a bimodal relation between serum lysozyme and prognosis in 232 patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2003;70:26-33.
2. Scheinecker C, Strobl H, Fritsch G, Csmarits B, Krieger O, Majdic O, et al. Granulomonocyte-associated lysosomal protein expression during in vitro expansion and differentiation of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995;86:4115-23.
3. Krugliak L, Meyer PR, Taylor CR. The distribution of lysozyme, alpha-1-antitrypsin, and alpha-1-antichymotrypsin in normal hematopoietic cells and in myeloid leukemias: an immunoperoxidase study on cytocentrifuge preparations, smears, and paraffin sections. *Am J Hematol* 1986;21:99-109.
4. Toth B, Wehrmann M, Kaiserling E, Horny H-P. Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukaemia in routinely processed bone marrow biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1999;52:688-92.
5. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JKC, et al. Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases (review). *Histopathol* 2002;41:1-29.

## 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