

**Monoclonal Mouse**  
**Anti-Human Epithelial Antigen/FITC**  
 Clone Ber-EP4  
**Code No./ Code/ Code-Nr. F 0860**  
 Edition/ Ausgabe 01.01.03

ENGLISH							
<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use. F 0860 is intended for use in flow cytometry. Anti-Human Epithelial Antigen can be used for detecting circulating tumor cells in peripheral blood, serous effusions and peritoneal washings together with a panel of other antibodies (1-3). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.						
<b>Synonym for antigen</b>	Ber-EP4 (1-7).						
<b>Introduction</b>	Cytologic diagnosis of reactive or malignant effusions using immunohistochemistry or flow cytometry is often difficult, especially in cases involving mesothelioma versus adenocarcinoma with overlapping histological features (3-7). The sensitivity of conventional cytology for the detection of malignant cells in effusions has been improved by using antibody combinations that include markers that are positive for mesothelioma and markers negative for mesothelioma and positive for carcinoma (4-7). Vimentin, HBME-1 and thrombomodulin are positive markers for mesothelioma (4, 5). The most commonly used epithelial markers of carcinomas include CEA, B72.3 (TAG-72), Leu-M1 (CD15), MOC-31, AH-6, HB-TN1, CA-125, and Ber-EP4 (3-7). In order to achieve optimal sensitivity and specificity of immunohistochemical or flow cytometric analysis it has been recommended to use antibody panels composed of 2, 3 or 4 carcinoma markers that includes Ber-EP4 (3-6).						
<b>Reagent provided</b>	The Anti-Human Epithelial Antigen conjugate, F 0860, has been produced from a purified monoclonal mouse antibody. 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). <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 0860</td> <td>FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)</td> <td>X 0927</td> </tr> </tbody> </table>	Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.	F 0860	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927
Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.					
F 0860	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927					
<b>Immunogen</b>	MCF-7 cell line (8).						
<b>Specificity</b>	Anti-Human Epithelial Antigen, Ber-EP4, is directed against a partially formalin-resistant epitope of a human epithelial antigen consisting of two glycoproteins of 34 and 39 kDa. The antigen is present on the surface membrane and in the cytoplasm of all epithelial cells except the superficial layers of squamous epithelia, hepatocytes and parietal cells (8). Flow cytometric analysis of malignant effusions has shown that Anti-Human Epithelial Antigen, Ber-EP4, labels carcinoma samples (16/17 cases (2) and 36/44 cases (3)). A few mesothelioma samples (2/3 cases) were also stained (3).						
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>For professional users.</li> <li>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>As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li> </ol>						
<b>Storage</b>	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.						
<b>Staining procedure</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.</li> <li>Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6.</li> <li>Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4.</li> <li>Mix 100 µL cell suspension with 10 µL F 0860.</li> <li>Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).</li> <li>Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.</li> <li>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.</li> <li>Analyse on a flow cytometer.</li> </ol>						

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>	Pour diagnostic in vitro. F 0860 est destiné pour un usage en cytométrie en flux. L'antigène Epithélial Anti-Humain peut être utilisé pour la détection des cellules tumorales circulatoires dans le sang périphérique, épanchements séreux et lavages péritonéaux ensemble avec un panel de d'autres anticorps (1-3). L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'historique clinique du patient et des autres examens diagnostics.						
<b>Synonyme pour l'antigène</b>	Ber-EP4 (1-7).						
<b>Introduction</b>	Le diagnostic cytologique des effusions réactives ou malignes utilisant l'immunohistochimie ou cytométrie en flux est souvent difficile, surtout dans des cas portant sur le mésothéliome versus adénocarcinome avec chevauchement des aspects histologiques (3-7). La sensibilité de la cytologie classique pour la détection des cellules malignes dans les épanchements a été améliorée en utilisant une combinaison d'anticorps qui comprend des marqueurs positifs au mésothéliome et négatifs au mésothéliome et positifs au carcinome (4-7). La Vimentine, HBME-1 et thrombomoduline sont des marqueurs positifs au mésothéliome (4, 5). Les marqueurs épithéliaux les plus fréquemment utilisés des carcinomes comprennent CEA, B72.3 (TAG-72), Leu-M1 (CD15), MOC-31, AH-6, HB-TN1, CA-125, et Ber-EP4 (3-7). Afin d'obtenir une sensibilité optimale et une spécificité d'analyse immunohistochimique ou cytométrique en flux, il est requis d'utiliser des panels d'anticorps composés de 2, 3 ou 4 marqueurs de carcinome comprenant Ber-EP4 (3-6).						
<b>Réactif fourni</b>	Le conjugué de l'Antigène Epithélial Anti-Humain, F 0860, a été produit à partir d'un anticorps monoclonal purifié de la souris. Le conjugué est fourni à l'état liquide en tampon contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et du NaN <sub>3</sub> à 15 mmol/L, pH 7,2. Chaque flacon contient 100 tests (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10 <sup>6</sup> de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain) <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>Code de l'anticorps</th> <th>Fluorochrome</th> <th>Code du Contrôle Négatif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F 0860</td> <td>FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)</td> <td>X 0927</td> </tr> </tbody> </table>	Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du Contrôle Négatif	F 0860	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927
Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code du Contrôle Négatif					
F 0860	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927					
<b>Immunogène</b>	Line cellulaire MCF-7 (8).						
<b>Spécificité</b>	Anti-Human Epithelial Antigen, Ber-EP4, attaque un épitope partiellement résistant au formol d'un antigène épithélial humain constitué de deux glycoprotéines de 34 et 39 kDa. L'antigène est présent sur la membrane de surface et dans le cytoplasme de toutes les cellules épithéliales excepté les couches superficielles de l'épithélium squameux, les hépatocytes et cellules pariétales (8). L'analyse cytométrique en flux des épanchements malins a révélé que l'Antigène Epithélial Anti-Humain, Ber-EP4, marque les échantillons du carcinome (16/17 cas (2) et 36/44 cas (3)). Quelques échantillons de mésothéliome (2/3 cas) étaient aussi marqués (3).						
<b>Précautions d'emploi</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Pour utilisateurs professionnels.</li> <li>Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), 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.</li> <li>Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.</li> </ol>						
<b>Conservation</b>	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.						
<b>Procédure d'immunomarquage</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.</li> <li>Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6.</li> <li>Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH.</li> <li>Mélanger 100 µL de suspension cellulaire avec 10 µL F 0860.</li> <li>Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).</li> <li>Laisser incubé à l'obscurité, à 4 °C, pendant 30 minutes.</li> <li>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.</li> <li>Analyser sur un cytomètre en flux.</li> </ol> <p>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. Noter que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, et les échantillons doivent être protégés de cette dernière au cours de la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.</p>						

**DEUTSCH**

**Zweckbestimmung** Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.  
 F 0860 ist für die durchflusszytometrische Anwendung bestimmt. Anti-Human Epithelial Antigen kann zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper zur Erfassung von im peripherem Blut zirkulierenden Tumorzellen, serösen Ergüssen und Peritonealspülungen eingesetzt werden (1-3). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

**Synonyme Bezeichnungen des Antigens** Ber-EP4 (1-7).

**Einleitung** Die zytologische Diagnose reaktiver oder maligner Ergüsse mit Hilfe der Immunhistochemie oder Durchfluss-Zytometrie ist oft schwierig, insbesondere bei der Abgrenzung von Mesotheliomen gegen Adenokarzinomen mit sich überschneidenden histologischen Merkmalen (3-7). Die Sensitivität der konventionellen Zytologie zur Bestimmung maligner Zellen in Ergüssen ist mithilfe von Antikörperkombinationen verbessert worden, die Marker mit einschließen, die auf Mesotheliome positiv reagieren, und Marker umfassen, die auf Mesotheliome negativ und auf Karzinome positiv reagieren (4-7). Vimentin, HBME-1 und Thrombomodulin sind Marker, die auf Mesotheliome positiv reagieren (4, 5). Zu den am häufigsten verwendeten Epithelmarkern von Karzinomen gehören CEA, B72.3 (TAG-72), Leu-M1 (CD15), MOC-31, AH-6, HB-TN1, CA-125 und Ber-EP4 (3-7). Um optimale Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen oder durchflusszytometrischen Analyse zu erzielen, wurde empfohlen, Antikörper-Panels zu verwenden, die aus 2, 3 oder 4 Karzinommarkern bestehen, zu denen Ber-EP4 gehört (3-6).

**Geliefertes Reagenz** Das Anti-Human Epithelial Antigen-Konjugat F 0860 wird aus einem gereinigten monoklonalen Mausantikörper hergestellt. 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 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10µL des Konjugats sind für bis 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).  
**Isotyp:** IgG1, Kappa. **Konjugat-Konzentration mg/L:** Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.
F 0860	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927

**Immunogen** MCF-7-Zelllinie (8).

**Spezifität** Anti-Human Epithelial Antigen, Ber-EP4, ist gegen ein teilweise formalinresistentes Epitop eines menschlichen Epithelantigens gerichtet, das aus zwei Glykoproteinen mit 34 und 39 kDa besteht. Das Antigen liegt auf der Oberflächenmembran und im Zellplasma aller Epithelzellen mit Ausnahme der äußeren Schichten von Plattenepithel, Leberepithelzellen und Parietalzellen vor (8).  
 Die durchflusszytometrische Analyse maligner Ergüsse hat gezeigt, dass Anti-Human Epithelial Antigen, Ber-EP4, Karzinomproben markiert (16/17 Fällen (2) und 36/44 Fällen (3)). Auch bei einigen Mesotheliomproben (2/3) kam es zu einer Anfärbung (3).

**Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (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.
- 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 Abtrennungsmidium 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 µl der Zellsuspension mit 10 µl F 0860 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 Fluoreszenzkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während des Färbevorgangs und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

**References/ Références/ Literatur**

- Kularatne BY, Lorigan P, Browne S, Suvarna SK, Smith MO, Lawry J. Monitoring tumour cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. Cytometry 2002;50:160-7.
- Risberg B, Davidson B, Dong HP, Nesland JM, Berner A. Flow cytometric immunophenotyping of serous effusions and peritoneal washings: comparison with immunocytochemistry and morphological findings. J Clin Pathol 2000;53:513-7.
- Davidson B, Dong HP, Berner A, Christensen J, Nielsen S, Johansen P, et al. Detection of malignant epithelial cells in effusions using flow cytometric immunophenotyping. Am J Clin Pathol 2002;118:85-92.
- Lozano MD, Panizo A, Toledo GR, Sola JJ, Pardo-Mindán J. Immunocytochemistry in the differential diagnosis of serous effusions. A comparative evaluation of eight monoclonal antibodies in Papanicolaou stained smears. Cancer 2001;93:68-72.
- Garcia-Prats MD, Ballestin C, Sotelo T, Lopez-Encuentra A, Mayordomo JI. A comparative evaluation of immunohistochemical markers for the differential diagnosis of malignant pleural tumours. Histopathology 1998;32:462-72.
- Motherby H, Kube M, Friedrichs N, Nadjari B, Knops K, Donner A, et al. Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology. I. Prevalence of markers in tumour cell positive and negative smears. Anal Cell Pathol 1999;19:7-20.
- Roberts F, Harper CM, Downie I, Burnett RA. Immunohistochemical analysis still has a limited role in the diagnosis of malignant mesothelioma. Am J Clin Pathol 2001;116:253-62.
- Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. J Clin Pathol 1990;43:213-9.

**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	