

Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DR Antigen/FITC, Clone AB3
Monoclonal Mouse Anti-Human HLA-DR Antigen/RPE, Clone AB3
Code No./ Code/ Code-Nr. F 7266
Code No./ Code/ Code-Nr. R 7267

ENGLISH										
Intended use	For in vitro diagnostic use. F 7266 and R 7267 are intended for use in flow cytometry. Antibodies to HLA-DR are considered essential for the initial evaluation of acute leukaemia, chronic T- and B-cell leukaemia and myeloid leukaemia when used together with a panel of other antibodies (1-3). F7266 and R7267 are not intended for tissue typing. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.									
Introduction	The main function of human leucocyte antigen (HLA) molecules is to present antigenic peptides to the T-cell receptor, thereby regulating the induction of the immune response (4). The HLA molecules are encoded by a cluster of tightly linked genes located on the short arm of chromosome 6. Three classes of HLA molecules (I, II and III) have been denoted. Human class II genes are located in the HLA-D region, consisting of three families called <i>DQ</i> , <i>DP</i> and <i>DR</i> (4). The products of class II genes form a heterodimeric transmembrane protein, consisting of a heavy (~34 kDa) α -chain and a light (~28 kDa) β -chain (4). The DR α -chain is expressed from one non-polymorphic gene, whereas the DR β -chain originates from nine highly polymorphic genes (4). HLA-DR antigen is constitutively expressed on antigen-presenting cells, such as B lymphocytes, monocytes and dendritic cells but can also be detected on activated T lymphocytes and activated granulocytes (4, 5). Occasionally, natural killer cells express HLA-DR antigen (1). The antigen has been found expressed in cases of different types of acute lymphoblastic leukaemias, acute myeloid leukaemias except AML-M3, chronic lymphoblastic leukaemias, chronic myeloid leukaemias and B- and T-cell non-Hodgkin's leukaemias (1-3, 6, 7). However, the antigen is normally not present on non-haematopoietic tumours and multiple myelomas (6).									
Reagent provided	The Anti-HLA-DR Antigen conjugates, F 7266 and R 7267, 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 human peripheral blood). <u>Isotype:</u> IgG2a, 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 7266</td> <td>FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)</td> <td>X 0933</td> </tr> <tr> <td>R 7267</td> <td>RPE (R-Phycoerythrin)</td> <td>X 0950</td> </tr> </tbody> </table>	Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.	F 7266	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0933	R 7267	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0950
Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.								
F 7266	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0933								
R 7267	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0950								
Immunogen	B cells from a follicular lymphoma.									
Specificity	Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3, reacts with the DRw52 determinant of the HLA-DR molecule. The specificity has been tested with transfectants expressing HLA-DRw52. Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3, does not react with transfectants expressing HLA-DP antigen and HLA-DQ antigen. The antibody has been submitted to the 8th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens 2000-2004.									
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 fluorochrome-conjugated Anti-HLA-DR Antigen. 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. 									
(106537-002)	F 7266/R 7267/EFG/TJA/27.11.03 p. 1/4									

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.

The escapee phenomenon has been described for FITC-conjugated HLA-DR antigen antibodies when using ammonium chloride (NH₄Cl)-based lysing reagents. The phenomenon can be reduced by inclusion of paraformaldehyde in the lysing reagent (8).

FRANÇAIS										
Intérêt	Pour diagnostic in vitro. Les anticorps F 7266 et R 7267 sont destinés à la cytométrie en flux. Les anticorps dirigés contre les antigènes HLA-DR sont considérés comme jouant un rôle essentiel dans l'évaluation initiale des leucémies aiguës, des leucémies chroniques à cellules B et T et des leucémies myéloïdes quand ils sont utilisés au sein d'un panel d'autres anticorps (1-3). Les anticorps F 7266 et R 7267 ne sont pas destinés au typage des tissus. L'interprétation des résultats doit être réalisée uniquement par un professionnel agréé dans le contexte de l'historique clinique du patient et d'autres examens.									
Introduction	La fonction principale des molécules d'antigènes leucocytaires humains (HLA) est de présenter les peptides antigéniques au récepteur des cellules T, régulant ainsi l'induction de la réponse immunitaire (4). Les molécules HLA sont codées par un groupe de gènes étroitement liés, situés sur le bras court du chromosome 6. Trois classes de molécules HLA (I, II et III) ont été identifiées. Les gènes de la classe II humaine sont situés dans la région HLA-D et sont constitués de trois familles appelées <i>DQ</i> , <i>DP</i> et <i>DR</i> (4). Les produits des gènes de classe II forment une protéine transmembranaire hétérodimerique constituée d'une chaîne lourde α de 34 kDa et d'une chaîne légère β de 28 kDa (4). La chaîne α DR est exprimée à partir d'un gène non polymorphe, alors que la chaîne β DR tire son origine de neuf gènes hautement polymorphes (4). L'antigène HLA-DR est exprimé constitutivement sur les cellules présentant l'antigène comme les lymphocytes B, les monocytes et les cellules dendritiques, mais il peut également être détecté sur les lymphocytes T activés et les granulocytes activés (4, 5). Parfois les cellules tueuses naturelles expriment l'antigène HLA-DR (1). L'expression de l'antigène a été observée dans divers types de leucémies lymphoblastiques aiguës, de leucémies myéloïdes aiguës sauf les LMA-M3, de leucémies lymphoblastiques chroniques, de leucémies myéloïdes chroniques et de leucémies non hodgkiniennes à cellules B et T (1-3, 6, 7). Cependant, l'antigène n'est pas normalement présent dans les cas de tumeurs non hématopoïétiques et de myélomes multiples (6).									
Réactif fourni	Les conjugués anti-antigène HLA-DR, F 7266 et R 7267, 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 NaN ₃ , à pH 7,2. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 μ L de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10 ⁶ leucocytes provenant de sang périphérique normal humain). <u>Isotype:</u> IgG2a, kappa. <u>Concentration du conjugué mg/L:</u> Se reporter à l'étiquette sur le flacon.									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Code de l'anticorps</th> <th>Fluorochrome</th> <th>Code Contrôle négatif n°</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F 7266</td> <td>FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)</td> <td>X 0933</td> </tr> <tr> <td>R 7267</td> <td>RPE (R-Phycoérythrine)</td> <td>X 0950</td> </tr> </tbody> </table>	Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code Contrôle négatif n°	F 7266	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0933	R 7267	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0950
Code de l'anticorps	Fluorochrome	Code Contrôle négatif n°								
F 7266	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0933								
R 7267	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0950								
Immunogène	Cellules B provenant d'un lymphome folliculaire.									
Spécificité	L'anticorps anti-antigène HLA-DR humain, AB3, réagit avec le déterminant DRw52 de la molécule HLA-DR. La spécificité a été testée avec des transfectants exprimant HLA-DRw52. L'anticorps anti-antigène HLA-DR humain, AB3, ne réagit pas avec des transfectants qui expriment l'antigène HLA-DP et l'antigène HLA-DQ. L'anticorps a été présenté lors du 8 ^{ème} International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens 2000-2004.									
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none"> Pour utilisateurs professionnels. Ce produit renferme de l'azide de sodium (NaN₃), 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. Comme pour tout produit d'origine biologique, des mesures de prudence s'imposent. 									
Conservation	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. 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.									
Procédure d'immunomarquage	<ol style="list-style-type: none"> Prélever le sang veineux dans un tube à essai 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 pH 7,2-7,4. Mélanger 100 μL de la suspension de cellules avec 10 μL d'anti-antigène HLA-DR conjugué au fluorochrome. 									
(106537-002)	F 7266/R 7267/EFG/TJA/27.11.03 p. 2/4									

- Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).
- Laisser incubé dans 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 à 1 % (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/L, à pH 7,4.
- 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.

Un phénomène d'échappement a été décrit pour les anticorps dirigés contre les antigènes HLA-DR conjugués au FITC, lors de l'utilisation de réactifs de lyse à base de chlorure d'ammonium (NH₄Cl). Ce phénomène peut être limité par l'incorporation de paraformaldéhyde au réactif de lyse (8).

DEUTSCH

Zweckbestimmung Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

F 7266 und R 7267 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. Antikörper gegen HLA-DR werden für die anfängliche Bewertung von akuter Leukämie, chronischer T- und B-Zell-Leukämie und myeloider Leukämie beim Gebrauch zusammen mit einem Antikörper-Panel als bedeutsam angesehen (1-3). F7266 und R7267 sind nicht für die Gewebetypisierung bestimmt. Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem Facharzt interpretiert werden.

Einleitung Die Hauptfunktion der humanen Leukozytenantigen- (HLA-) Moleküle besteht in der Bereitstellung antigener Peptide für den T-Zell-Rezeptor, wodurch die Induktion der Immunantwort reguliert wird (4). Die HLA-Moleküle werden von einem Haufen eng miteinander verbundener Gene kodiert, die sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 befinden. Es wurden drei Klassen von HLA-Molekülen festgestellt (I, II und III). Humane Klasse-II-Gene befinden sich in der HLA-D-Region und bestehen aus den drei Familien *DQ*, *DP* und *DR* (4). Die Produkte der Klasse-II-Gene bilden ein heterodimeres Transmembranprotein, das aus einer schweren α -Kette (~34 kDa) und einer leichten β -Kette (~28 kDa) besteht (4). Die DR- α -Kette wird von einem nicht polymorphen Gen exprimiert, während die DR- β -Kette ihren Ursprung in neun hoch polymorphen Genen hat (4).

Das HLA-DR-Antigen wird im Wesentlichen auf Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert, kann aber auch auf aktivierten T-Lymphozyten und aktivierten Granulozyten nachgewiesen werden (4, 5). Gelegentlich wird das HLA-DR-Antigen von natürlichen Killerzellen exprimiert (1). Eine Expression des Antigens wurde in Fällen unterschiedlicher Typen von akuten lymphoblastischen Leukämien, akuten myeloiden Leukämien mit Ausnahme von AML-M3, chronischen lymphoblastischen Leukämien, chronischen myeloiden Leukämien sowie B- und T-Zell-Non-Hodgkin-Leukämien exprimiert (1-3, 6, 7). Das Antigen ist jedoch bei nicht hämatopoetischen Tumoren und multiplen Myelomen normalerweise nicht vorhanden (6).

Geliefertes Reagenz Die Anti-HLA-DR-Antigenkonjugate F 7266 und R 7267 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-Wert 7,2 geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 μ L des Konjugats sind für bis 10⁶ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Isotyp: IgG2a, Kappa. **Konjugatkonzentration mg/L:** Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.
F 7266	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0933
R 7267	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0950

Immunogen B-Zellen aus einem folliculären Lymphom.

Spezifität Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3, reagiert mit der DRw52-Determinante des HLA-DR-Moleküls. Die Spezifität wurde mit Transfektanten getestet, die HLA-DRw52 exprimieren. Anti-Human HLA-DR Antigen, AB3, zeigt keine Reaktion mit Transfektanten, die HLA-DP Antigen und HLA-DQ Antigen exprimieren. Der Antikörper wurde auf dem 8. International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens 2000-2004 vorgestellt.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), 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.
- 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-Wert 7,2-7,4 waschen.
- 100 μ L der Zellsuspension mit 10 μ L des fluorochromkonjugierten Anti-HLA-DR Antigen 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-Wert 7,4 resuspendieren.
- Im Durchflusszytometer analysieren.






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

Das Fluchtphänomen wurde für FITC-konjugierte HLA-DR Antigen-Antikörper bei der Verwendung von Lysierungsreagenzien auf Ammoniumchlorid- (NH₄Cl-) Basis beschrieben. Das Phänomen kann mittels Einschluss von Paraformaldehyd in das Lysierungsreagenz verringert werden (8).

References/ Références/ Literatur

- Van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukaemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editors. Leukemia. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company; 1996. p. 83-130.
- Mittelman M, Karcher DS, Kammerman LA, Lessin LS. High Ia (HLA-DR) and low CD11b (Mo1) expression may predict early conversion to leukemia in myelodysplastic syndromes. Am J Hematol 1993;43:165-71.
- De Zen L, Orfao A, Cazzaniga G, Masiero L, Cocito MG, Spinelli M, et al. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. Leukemia 2000;14:1225-31.
- Naverrete CV. The HLA system in blood transfusion. Baillière's Clin Haematol 2000;13:511-32.
- Erber WN, Pinching AJ, Mason DY. Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. Lancet 1984;i:1042-5.
- Falini B, Martelli F, Tarallo F, Moir DJ, Cordell JL, Gatter KC, et al. Immunohistological analysis of human bone marrow trephine biopsies using monoclonal antibodies. Br J Haematol 1984;56:365-86.
- Smith MEF, Holgate CS, Williamson JMS, Grigor I, Quirke P, Bird CC. Major histocompatibility complex class II antigen expression in B and T cell non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Pathol 1987;40:34-41.
- Prince HE, York J, Kuttner DK. Reduction of escapee formation in flow cytometric analysis of lymphocyte subsets. J Immunol Methods 1994;177:165-73.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser jusque 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'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	LOT	Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung