

## MultiMix™

### Dual-Colour Reagent

### Anti-Human Kappa Light Chains/FITC

### Anti-Human CD19/RPE

### Code No./ Code/ Code-Nr. FR048

## ENGLISH

#### Intended use

For in vitro diagnostic use.

FR048 is intended for use in flow cytometry for simultaneous detection and enumeration of kappa light chains on human B cells. In flow cytometry, antibodies to kappa light chains are useful for the demonstration of cell surface kappa light chains, and, thus, for the identification of monoclonality (clonal excess) in B-cell lymphoproliferative disorders together with a panel of other antibodies (1-4). 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 (5). CD19 expression is maintained in B-lineage cells that have undergone neoplastic transformation (6). Antibodies to CD19 are considered essential for the initial evaluation of acute and chronic lymphoproliferative disorders (7). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

#### Reagent provided

FR048 comprises the following two, carefully matched, fluorescent antibodies:

Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, conjugated with R-phycoerythrin (RPE).

The two conjugates in FR048, Anti-Kappa Light Chains and Anti-CD19, have been produced from F(ab')<sub>2</sub> fragment of affinity-isolated polyclonal rabbit antibody and purified monoclonal mouse antibodies of isotype IgG1, kappa, respectively. FR048 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 50 tests (10 µL of conjugate for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood).

Antibody Code No.	Fluorochrome	Control Reagent Code No.
FR048	FITC and RPE	X0952

#### Immunogens

Anti-Kappa Light Chains: Polyclonal immunoglobulin light chains of kappa type isolated from a pool of human sera.

Anti-CD19, HD37: Hairy cell leukaemia cells.

#### Specificity

Anti-Kappa Light Chains reacts with free kappa chains as well as kappa chains in intact immunoglobulin molecules. The specificity has been ascertained as described below. To obtain maximum sensitivity, the crossed immunoelectrophoresis specificity test was performed prior to affinity purification and pepsin degradation.

**Crossed immunoelectrophoresis:** Only kappa-related precipitates appear when the antibody is run against human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue.

**Flow cytometry:** When Anti-Kappa Light Chains is applied as described in the staining procedure in combination with Anti-CD19/RPE, HD37, on lysed human whole blood, a specific staining of a part of the CD19-positive B lymphocytes is seen corresponding to the expected range of kappa light chain expression.

Flow cytometric analysis of single cell suspensions from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples demonstrated that Anti-Kappa Light Chains labels reactive hyperplastic lymph nodes (10/10 cases). In non-Hodgkin's lymphomas, the antibody labeled 4/10 cases. The remaining cases were positive for lambda light chains (5/10 cases) or showed no expression of light chains (1/10 cases) (4).

Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes demonstrated that Anti-Kappa Light Chains labels a proportion of B-cell chronic lymphocytic leukaemias. Thus, in one study of 121 cases (2), 37 were positive for kappa. In another study of 165 cases (3), 97 were positive for kappa.

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 (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).

#### Precautions

- For professional users.
- 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.
- 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

Before staining samples of peripheral blood, the mononuclear cells must be isolated by centrifugation on a separation medium or the blood sample washed to remove the soluble serum proteins. As human monocytes bind serum immunoglobulins via their surface Fc receptors, these cells should be removed by depletion or identified.

- Transfer 100 µL of anticoagulated (EDTA) blood to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube.
- Add 2 mL of PBS (DakoCytomation code No. S3024). Mix gently by using a vortex mixer.
- Centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 µL of fluid in the tube.
- Repeat steps 2 and 3 two more times.
- Add 10 µL Rabbit Immunoglobulin Fraction (DakoCytomation code No. X0903) for blocking. Mix gently by using a vortex mixer and incubate the tube at 37 °C for 30 minutes.
- Add 10 µL of FR048 and mix gently by using a vortex mixer.
- Incubate the tube in the dark at 2-8 °C for 30 minutes or at room temperature (20-25 °C) for 15-30 minutes.
- Add 100 µL of Uti-Lyse™ Reagent A (DakoCytomation code No. S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
- Add 1 mL of Uti-Lyse™ Reagent B (DakoCytomation code No. S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
- Centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 µL of fluid in the tube.
- Add 2 mL of PBS to the tube and resuspend the cells by using a vortex mixer.
- Repeat step 10.
- Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL PBS.
- Analyse the sample on a flow cytometer or store it in the dark at 2-8 °C until analysis. Samples should be analysed within 24 hours after staining.

(103459-002) FR048/EFG/MTH/31.01.05 p. 1/4

Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

#### Procedural notes

Step 1: It is optional to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control.

Step 6: The volume of conjugate recommended is a guideline only. Optimal staining conditions may vary depending on specimen and preparation method and should be determined by each individual laboratory.

It is optional to include a control reagent test tube. The control reagent should match the conjugated antibody reagent. The recommended Dual-Colour Control Reagent for FR048 is DakoCytomation code No. X0952.

Steps 8 and 9: If another cell-lysing reagent is used, please follow the recommendations for that reagent. Note that if the alternative lysing reagent does not contain fixative, such as DakoCytomation EasyLyse™, code No. S2364, the PBS in step 13 should contain 1% paraformaldehyde unless the sample is analysed within the time frame recommended for the lysing reagent.

Step 14: Abnormal numbers of cells expressing the target antigen or cells showing aberrant expression levels of the antigen can be expected in some disease states. This may result in an altered pattern of staining. It is important to understand the normal expression pattern of an antigen and its relationship to the expression of other relevant antigens in order to perform appropriate analysis.

Multicolour reagents are preferable to single-colour reagents for the comprehensive analysis of flow cytometry specimens. The correct use of colour compensation is particularly important in multicolour analysis.

## FRANÇAIS

#### Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

FR048 est destiné pour un usage en cytométrie en flux pour effectuer, simultanément, la détection et l'énumération des chaînes légères kappa situées sur les lymphocytes-B humains. En cytométrie en flux, les anticorps anti-chaînes légères kappa sont utiles pour la détermination des chaînes légères kappa de la surface cellulaire, et donc aussi, accompagné d'un panel d'anticorps, pour l'identification de la monoclonalité (excès clonal) dans les syndromes lymphoprolifératifs (1-4). 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 (5). L'expression du CD19 est conservée dans les cellules de la lignée B ayant subi une transformation néoplasique (6). Les anticorps dirigés contre le CD19 sont considérés comme essentiels lors de l'évaluation initiale des troubles lymphoprolifératifs aigus et chroniques (7). 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.

#### Réactif fourni

FR048 comprend les deux anticorps fluorescents, soigneusement associés suivants:

Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains conjugué avec l'isomère 1 de l' isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, conjugué avec R-phycoérythrine (RPE).

Les deux conjugués dans FR048, Anti-Kappa Light Chains et Anti-CD19, ont été produits à partir du fragment F(ab)<sub>2</sub> de l'anticorps polyclonal de lapin isolé par affinité et des anticorps monoclonaux de souris purifiés, respectivement de l'isotype IgG1 et kappa. FR048 est fourni à l'état liquide dans un tampon contenant 1% de l'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub>, pH 7,2. Chaque flacon contient 50 tests (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10<sup>6</sup> de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain).

Code de l' anticorps	Fluorochrome	Code du Réactif de contrôle
FR048	FITC et RPE	X0952

#### Immunogène

Anti-Kappa Light Chains: Les chaînes légères de type kappa des immunoglobulines polyclonales, isolées du plasma humain.

Anti-CD19, HD37: Cellules leucémiques tricholeucocytaires.

#### Spécificité

Anti-Kappa Light Chains montrent une réaction aux chaînes kappa libres, ainsi qu'aux chaînes kappa des molécules d'immunoglobuline restées intactes. Sa spécificité a été déterminée de la manière décrite ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité d'immunoelectrophorèse croisée a été effectué avant la purification par affinité et la dégradation à la pepsine.

**Immuno-électrophorèse croisée:** Seuls des précipités liés à kappa apparaissent lorsque l'anticorps est testé pour du plasma humain. Marquage: Bleu de Coomassie.

**Cytométrie de flux:** Lorsque Anti-Kappa Light Chains est appliquée selon la procédure d'immunomarquage ie combinaison avec Anti-CD19/RPE, HD37, sur du sang humain etal lysé, un marquage spécifique d'une partie des lymphocytes-B positifs au CD19 est rendu visible et correspondant aux résultats attendus pour l'expression des chaînes légères kappa.

L'analyse en cytométrie de flux des suspension cellulaires des échantillons de tissus inclus en paraffine, fixés au formol ont déterminé que Anti-Kappa Light Chains marquent les ganglions lymphatiques hyperblastiques réactives (10/10 cas). Dans les lymphomes non-Hodgkiniens, l'anticorps marquait 4/10 cas. Les cas restants étaient positifs pour les chaînes lambda légères (5/10 cases) ou ne montraient aucune expression de chaînes légères (1/10 ca) (4).

L'analyse en cytométrie en flux des lymphocytes du sang périphérique a déterminé que Anti-Kappa Light Chains marquent une proportion de leucémies lymphocytiques chroniques à lymphocytes-B. Ainsi, dans une étude de 121 cas (2), 37 étaient positifs pour kappa. Dans une autre étude de 165 cas (3), 97 étaient positifs pour kappa.

HD37, Anti-CD19, a été intégré au cours des Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens et des études dans un certain nombre de laboratoires ont confirmé sa réactivité avec CD19 (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 réstions 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 hématopoiétique humain et ne réagissait pas avec les cellules non hématopoiétiques, par exemple les cellules du tissu rénal, hépatique, mammaire ou pulmonaire (8).

#### Précautions d'emploi

- Pour utilisateurs professionnels.
- 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.
- Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

#### Conservation

Conservr 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 de coloration

Avant de colorer des échantillons de sang périphérique, isoler les cellules mononucléées par centrifugation sur un support séparé ou laver l'échantillon de sang pour éliminer les protéines sériques solubles. Étant donné que les monocytes humains lient les immunoglobulines sériques via leurs récepteurs Fc de surface, éliminer ces cellules par déplétion ou les identifier.

- Transférer 100 µL de sang non coagulé (EDTA) dans un tube à essai en polystyrène de 12 mm x 75 mm.
- Ajouter 2 mL de PBS (réf. DakoCytomation S3024). Mélanger doucement à l'aide d'un vortex.
- Centrifuger le tube à 300 g pendant 5 minutes. Aspirer doucement le surnageant et l'éliminer en laissant environ 50 µL de liquide dans le tube.
- Répéter deux fois les étapes 2 et 3.
- Ajouter 10 µL de fraction d'immunoglobuline de lapin (réf. DakoCytomation X0903) pour bloquer. Mélanger doucement à l'aide d'un vortex et incuber le tube à 37 °C pendant 30 minutes.

(103459-002) FR048/EFG/MTH/31.01.05 p. 2/4

