

MultiMix™

Dual-Colour Reagent

Anti-Human Kappa Light Chains/FITC

Anti-Human Lambda Light Chains/RPE

Code No./ Code/ Code-Nr. FR481

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FR481 is intended for use in flow cytometry for simultaneous detection and enumeration of kappa light chains and lambda light chains. In flow cytometry, antibodies to kappa light chains are useful for the demonstration of cell surface kappa light chains, and antibodies to lambda light chains are useful for the demonstration of cell surface lambda 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). 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

FR481 comprises the following two, carefully matched, fluorescent antibodies:

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

Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains, conjugated with R-phycoerythrin (RPE).

The two conjugates in FR481, Anti-Kappa Light Chains and Anti-Lambda Light Chains conjugate have been produced from F(ab')₂ fragments of affinity-isolated polyclonal rabbit antibodies. FR481 is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Each vial contains 50 tests (10 µL of conjugate for up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).

Antibody Code No.	Fluorochrome	Control Reagent Code No.
FR481	FITC and RPE	X0935

Immunogens

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

Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains: Polyclonal immunoglobulin light chains of lambda type isolated from a pool of human sera.

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/FITC 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.

Anti-Lambda Light Chains reacts with free lambda chains as well as lambda 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 lambda-related precipitates appear when the antibody is run against human plasma. Staining: Coomassie Brilliant Blue.

Flow cytometry: When Anti-Lambda Light Chains/RPE is applied as described in the staining procedure in combination with Anti-CD19/FITC, 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 lambda light chain expression.

Flow cytometry: When FR481 is applied as described in the staining procedure, on lysed human whole blood, a specific staining of a part of the lymphocytes is seen, within the expected range of kappa and lambda light chains expression.

Flow cytometric analysis of single suspensions from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples demonstrated that Anti-Lambda Light Chains labels reactive hyperplastic lymph nodes (10/10 cases), and so does Anti-Kappa Light Chains (10/10 cases). In non-Hodgkin's lymphomas, the antibody labeled 5/10 cases. The remaining cases were positive for kappa light chains (4/10 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 and Anti-Lambda Light Chains, respectively, label a proportion of B-cell chronic lymphocytic leukaemias. Thus, in one study of 121 cases (2), 37 were positive for kappa and 17 were positive for lambda. In another study of 165 cases (3), 97 were positive for kappa and 68 were positive for lambda.

Precautions

- 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

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 FR481 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.

FR481/EFG/MTH/11.03.05 p. 1/4

- 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.

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 FR481 is DakoCytomation code No. X0935.

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

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

FR481 est destiné à être utilisé dans le cadre d'une cytométrie en flux pour effectuer, simultanément, la détection et l'énumération des chaînes légères kappa et lambda. En cytométrie en flux, les anticorps anti-chaînes légères kappa sont utiles pour mettre en évidence les chaînes légères kappa de la surface cellulaire, de même les anticorps anti-chaînes légères lambda sont utiles pour mettre en évidence les chaînes lambda légères de la surface cellulaire; et donc permettre ainsi l'identification de la monoclonalité (excès clonal), accompagné d'un panel d'autres anticorps dans des syndromes lymphoprolifératifs de type lymphocytes-B (1-4). L'interprétation des résultats doit être effectuée dans un contexte tenant compte des antécédants cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques réalisées par un pathologiste qualifié.

Réactifs fournis

FR481 comprend les deux anticorps fluorescents ci-dessous qui ont été soigneusement associés :

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

Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains, conjugué avec phycoérythrine-R (RPE).

Les deux conjugués dans FR481, Anti-Kappa Light Chains et Anti-Lambda Light Chains ont été produits à partir d'un F(ab')₂ qui est un fragment d'un anticorps polyclonal de lapin isolé par affinité

FR481 est fourni sous forme liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/L de NaN₃, pH 7,2. Chaque flacon permet de réaliser 50 analyses (10 µL de conjugué pour jusqu'à 10⁶ leucocytes du sang humain normal périphérique).

Numéro de code des anticorps	Fluorochrome	Code du Réactif de contrôle
FR481	FITC and RPE	X0935

Immunogènes

Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains: chaînes légères polyclonales d'immunoglobuline de type kappa isolées à partir d'un mélange de sera humains.

Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains: chaînes légères polyclonales d'immunoglobuline de type lambda isolées à partir d'un mélange de sera humains.

Spécificité

Anti-Kappa Light Chains réagit avec les chaînes kappa libres et aussi avec les chaînes kappa des molécules d'immunoglobuline restées intactes. La spécificité a été vérifiée de la façon décrite ci-dessous. Afin d'obtenir une sensibilité maximum, l'analyse en immunoelectrophorèse croisée a été menée avant la purification par affinité et la dégradation de la pepsine.

Immunoelectrophorèse croisée: Seuls des précipités liés à kappa apparaissent quand l'anticorps est testé avec du plasma humain. Coloration: Bleu de Coomassie.

Cytométrie en flux : Lorsque Anti-Kappa Light Chains est appliqué selon la procédure de coloration en combinaison avec Anti-CD19/RPE, HD37, sur du sang humain total lysé, une coloration spécifique d'une partie des lymphocytes-B positifs au CD19 est rendue visible et elle correspond aux résultats attendus pour l'expression des chaînes légères kappa.

Anti-Lambda Light Chains réagit avec les chaînes lambda libres et aussi avec les chaînes lambda des molécules d'immunoglobuline restées intactes. La spécificité a été vérifiée de la façon décrite ci-dessous. Afin d'obtenir une sensibilité maximum, l'analyse en immunoelectrophorèse croisée a été menée avant la purification par affinité et la dégradation de la pepsine.

Immunoelectrophorèse croisée: Seuls des précipités liés à lambda apparaissent quand l'anticorps est testé avec du plasma humain. Coloration: Bleu de Coomassie.

Cytométrie en flux: Lorsque Anti-Lambda Light Chains est appliqué selon la procédure de coloration en combinaison avec Anti-CD19/FITC, HD37, sur du sang humain total lysé, une coloration spécifique d'une partie des lymphocytes-B positifs au CD19 est rendue visible et elle correspond aux résultats attendus pour l'expression des chaînes légères lambda.

Cytométrie en flux : Lorsque le FR481 est appliqué selon la procédure de coloration, sur du sang total humain lysé, une coloration spécifique d'une partie des lymphocytes est visible et elle correspond aux résultats attendus pour l'expression des chaînes légères kappa et lambda.

L'analyse par cytométrie en flux de suspensions cellulaires simples provenant d'échantillons de tissus en paraffine fixés à la formaline a démontré que Anti-Lambda Light Chains marque les ganglions lymphatiques hyperplastiques réactifs (10/10 cas), il est de même pour Anti-Kappa Light Chains (10/10 cas). Dans les lymphomes non-hodgkiniens, l'anticorps a marqué 5/10 cas. Les cas restants étaient positifs pour les chaînes kappa légères (4/10 cases) ou ne montraient aucune expression de chaîne légère (1/10 cas) (4).

L'analyse en cytométrie de flux de lymphocytes du sang périphérique a mis en évidence que Anti-Kappa Light Chains et Anti-Lambda Light Chains marquent respectivement une proportion de leucémies lymphocytiques chroniques à lymphocytes-B. Ainsi, dans une étude de 121 cas (2), 37 étaient positifs pour kappa et 17 pour Lambda. Dans une autre étude de 165 cas (3), 97 étaient positifs pour kappa et 68 étaient positifs pour Lambda.

Précautions d'emploi

- Pour utilisateurs professionnels uniquement.
- 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 ou 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.
- Ce produit renferme des matières d'origine animale, par conséquent il doit être manipulé comme s'il était potentiellement infectieux.

Stockage

Conservé à 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, leur état doit être vérifié par les utilisateurs. L'instabilité de ce produit ne donne aucun signe particuliers. Des contrôles positifs et négatifs doivent donc être menés en même temps que l'analyse des spécimens du patient. Si vous observez une coloration inattendue qui ne peut pas être expliquée par des variations dans les procédures du laboratoire et que vous soupçonnez un problème relatif à l'anticorps, 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.

(103460-002)

FR481/EFG/MTH/11.03.05 p. 2/4

- 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.
- Ajouter 10 µL de FR481 et mélanger doucement à l'aide d'un vortex.
- Incuber le tube dans l'obscurité à 2–8 °C pendant 30 minutes ou à température ambiante (20–25 °C) pendant 15 à 30 minutes.
- Ajouter 100 µL de Réactif A Uti-Lyse™ (réf. DakoCytomation S3325) au tube et mélanger doucement à l'aide d'un vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.
- Ajouter 1 mL de Réactif B Uti-Lyse™ (réf. DakoCytomation S3325) au tube et mélanger doucement à l'aide d'un vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.
- 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.
- Ajouter 2 mL de PBS au tube et remettre les cellules en suspension à l'aide d'un vortex.
- Répéter l'étape 10.
- Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de PBS.
- Analysér l'échantillon sur un cytomètre en flux ou conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C jusqu'à l'analyse. Analyser les échantillons dans les 24 heures qui suivent la coloration.

Noter que les conjugués fluorochromes sont photosensibles. Les échantillons doivent être protégés de la lumière pendant la procédure de coloration et jusqu'à l'analyse.

Remarques sur la procédure

Étape 1: Il est facultatif d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif approprié avec chaque cycle en tant que contrôle de réactif et de préparation.

Étape 6: Le volume de conjugué n'est donné qu'à titre indicatif. Les conditions de coloration optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et de la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement.

Un tube à essai de réactif de contrôle est facultatif. Le réactif de contrôle doit correspondre au réactif anticorps conjugué. Le réactif de contrôle bicolore recommandé pour FR481 est DakoCytomation réf. X0935.

Étapes 8 et 9: Si un autre réactif de lyse de cellule est utilisé, suivre les recommandations pour ce réactif. Noter que si l'autre réactif de lyse ne contient pas de fixateur comme le DakoCytomation EasyLyse™, réf. S2364, le PBS de l'étape 13 doit contenir 1 % de paraformaldéhyde sauf si l'échantillon est analysé dans les délais recommandés pour le réactif de lyse.

Étape 14: Pour certaines maladies, on peut s'attendre à obtenir des anomalies du nombre de cellules exprimant l'antigène cible ou des niveaux aberrants d'expression de l'antigène. Ceci peut modifier le profil de coloration. Afin d'effectuer des analyses appropriées, il est important de comprendre le profil d'expression normal de l'antigène et ses relations avec l'expression d'autres antigènes pertinents.

Les réactifs multicolores sont préférables aux réactifs unicolores pour l'analyse complète des échantillons de cytométrie en flux. L'utilisation correcte de la compensation de couleur est particulièrement importante dans les analyses multicolores.

<p>DEUTSCH</p>

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

FR481 ist für den durchflusszytometrischen Gebrauch sowie für den gleichzeitigen Nachweis und die Auszählung von Kappa-Leichketten und Lambda-Leichtketten bestimmt. In der Durchflusszytometrie sind Antikörper gegen Kappa-Leichtketten hilfreich für den Nachweis von Kappa-Leichtketten auf Zelloberflächen und Antikörper gegen Lmabda-Leichtketten sind hilfreich für den Nachweis von Lambda-Leichtketten auf Zelloberflächen. Bei Verwendung zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper sind sie somit nützlich für die Identifizierung von Monoklonalität (klonaler Überschuss) bei lymphoproliferativen B-Zellen-Störungen (1-4). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

Geliefertes Reagenz

FR481 umfasst die folgenden zwei, sorgfältig aufeinander abgestimmten Fluoreszenz-Antikörper:

Polyclonal Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains, mit Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1 (FITC) konjugiert.

Polyclonal Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains, mit R-Phycoerythrin (RPE) konjugiert.

Die beiden Konjugate in FR481, Anti-Kappa Light Chains und Anti-Lambda Light Chains-Konjugat, wurden aus F(ab')2 Fragmenten von affinitätsisolierten polyklonalen Kaninchen-Antikörpern produziert. FR481 wird in einer gepufferten Lösung mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L NaN3, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 50 Tests (10 µL des Konjugats sind für bis 10⁵ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Kontrollreagenz Code-Nr.
FR481	FITC und RPE	X0935

Immunogene

Rabbit Anti-Human Kappa Light Chains: Aus einem Humanseren-Pool isolierte polyklonale Immunglobulinleichtketten vom Kappa-Typ.

Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains: Aus einem Humanseren-Pool isolierte polyklonale Immunglobulinleichtketten vom Lambda-Typ.

Spezifität

Anti-Kappa Light Chains reagiert mit freien Kappa-Ketten sowie mit Kappa-Ketten in intakten Immunglobulin-Molekülen. Die Spezifität wurde wie unten beschrieben nachgewiesen. Um eine maximale Sensitivität zu erhalten, wurde der Kreuz-Immunelektrophorese-Spezifitätstest vor der Affinitätsreinigung und dem Pepsinabbau durchgeführt.

Kreuzimmunelektrophorese: Nur Kappa-bezogene Präzipitate erscheinen, wenn der Antikörper gegen menschliches Plasma getestet wird. Anfärben: Coomassie® Brillantblau.

Durchfluss-Zytometrie: Wird Anti-Kappa Light Chains/FITC wie unter „Färbeprozedur“ beschrieben in Verbindung mit Anti-CD19/RPE, HD37 auf lysiertem menschlichem Vollblut verwendet, kann eine spezifische Färbung eines Teils der CD19-positiven B-Lymphozyten beobachtet werden, die dem erwarteten Bereich der Kappa-Leichtketten-Expression entspricht.

Anti-Lambda Light Chains reagiert mit freien Lambda-Ketten sowie mit Lambda-Ketten in intakten Immunglobulin-Molekülen. Die Spezifität wurde wie unten beschrieben gesichert: Um eine maximale Sensitivität zu erhalten, wurde der Kreuz-Immunelektrophorese-Spezifitätstest vor der Affinitätsreinigung und dem Pepsinabbau durchgeführt.

Kreuzimmunelektrophorese: Nur Lambda-bezogene Präzipitate erscheinen, wenn der Antikörper gegen menschliches Plasma getestet wird. Anfärben: Coomassie® Brillantblau.

Durchfluss-Zytometrie: Wird Anti-Lambda Light Chains/FITC wie unter „Färbeprozedur“ beschrieben in Verbindung mit Anti-CD19/FITC, HD37 auf lysiertem menschlichem Vollblut verwendet, kann eine spezifische Färbung eines Teils der CD19-positiven B-Lymphozyten beobachtet werden, die dem erwarteten Bereich der Lambda-Leichtketten-Expression entspricht.

Durchfluss-Zytometrie: Bei der Anwendung von FR481 auf lysiertem menschlichem Vollblut, wie unter „Färbeprozedur“ beschrieben, kann eine spezifische Färbung eines Teils der Lymphozyten innerhalb des erwarteten Bereichs der Expression der Kappa- und Lambda- Leichtketten beobachtet werden.

Die durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen aus formalinfixierten, paraffingebetteten Gewebeproben zeigte, dass Anti-Lambda Light Chains reaktive hyperplastische Lymphknoten (10/10 Fällen) markiert. Dies gilt gleichermaßen für Anti-Kappa Light Chains (10/10 Fällen). Bei Non-Hodgkin-Lymphom markierte der Antikörper 5/10 der Fälle. Die verbleibenden Fälle waren positiv für Kappa-Leichtketten (4/10 Fällen) oder zeigten keine Expression von leichten Ketten (1/10 Fällen) (4).

Die durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten aus peripherem Blut wies nach, dass Anti-Kappa Light Chains und Anti-Lambda Light Chains jeweils einen Teil der chronischen lymphozytären B-Zellen-Leukämien markiert. So waren in einer Studie von 121 Fällen (2) 37 positiv für Kappa und 17 positiv für Lambda. In einer anderen Studie von 165 Fällen (3) waren 97 positiv für Kappa und 68 positiv für Lambda..

(103460-002)	FR481/EFG/MTH/11.03.05 p. 3/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN3), 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.

3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.

Aufbewahrung

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.

Färbeverfahren

Bevor Proben aus peripherem Blut gefärbt werden können, müssen die mononukleären Zellen durch Zentrifugieren auf einem Trennmedium isoliert oder die Blutprobe gewaschen werden, um die löslichen Serumproteine zu entfernen. Da humane Monozyten über ihre Oberflächen-Fc-Rezeptoren Serumimmunglobuline binden, sollten diese Zellen durch Depletion oder Identifizierung entfernt werden.

- 100 µL antikoaguliertes (EDTA) Blut in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
- 2 ml PBS (DakoCytomation Code-Nr. S3024) hinzufügen. Mit dem Vortexer sorgfältig mischen.
- 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriggassen.
- Schritte 2 und 3 zweimal wiederholen.
- Zur Blockierung 10 µL Kaninchen-Immunglobulin-Fraktion (DakoCytomation Code-Nr. X0903) hinzugeben. Mit dem Vortexer sorgfältig mischen und das Teströhrchen 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- 10 µL FR481 dazugeben und vorsichtig mit einem Vortexer mischen.
- 30 Minuten im Dunkeln bei 2–8 °C oder 15–30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.
- 100 µL Uti-Lyse™ Reagent A (DakoCytomation Code-Nr. S3325) dazugeben und vorsichtig mit einem Vortexer mischen. Das Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- 1 µL Uti-Lyse™ Reagent B (DakoCytomation Code-Nr. S3325) dazugeben und vorsichtig mit einem Vortexer mischen. Das Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriggassen.
- 2 mL PBS dazugeben und die Zellen mit einem Vortexer resuspendieren.
- Schritt 10 wiederholen.
- Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z.B. 0,3 mL PBS, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
- Die Probe auf einem Durchflusszytometer analysieren oder bis zur Analyse bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Die Proben sollten innerhalb von 24 Stunden nach dem Färben analysiert werden.

Bitte beachten, dass Fluorochrom-Konjugate lichtempfindlich sind und die Proben während des Färbeverfahrens und bis zur Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

Hinweise

Schritt 1: Als Kontrolle für das Reagenz und das Präparat kann bei jedem Durchlauf eine geeignete positive und negative Kontrollprobe mitlaufen.

Schritt 6: Das empfohlene Volumen des Konjugats gilt nur als Richtlinie. Optimale Färbungsbedingungen können je nach Probe und Präparationsmethode unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst bestimmt werden.






Es kann auch ein Teströhrchen mit einem Kontrollreagenz mitgefärbt werden. Das Kontrollreagenz sollte dem konjugierten Antikörperreagenz entsprechen. Für FR481 wird DakoCytomation Code-Nr. X0935 als zweifarbiges Kontrollreagenz empfohlen.

Schritte 8 und 9: Falls ein anderes Zell-Lysereagenz verwendet wird, bitte die Empfehlungen für dieses Reagenz befolgen. Falls das alternative Lysereagenz kein Fixiermittel wie DakoCytomation EasyLyse™, Code-Nr. S2364 enthält, sollte die PBS in Schritt 13 1% Paraformaldehyd enthalten, außer wenn die Probe innerhalb des für das Lysereagenz empfohlenen Zeitrahmens analysiert wird.

Schritt 14: Bei einigen Krankheitsbildern sind anomale Mengen von Zellen, die die Zielantigene exprimieren, oder abweichende Antigen-Expressionsgrade zu erwarten. Dies kann zu einem veränderten Färbemuster führen. Um entsprechende Analysen durchführen zu können, ist es wichtig, das normale Expressionsmuster der Antigene und deren Verhältnis zur Expression anderer relevanter Antigene zu kennen.

Für die umfangreiche Analyse von Durchflusszytometrieproben werden mehrfarbige Reagenzien gegenüber einfarbigen Reagenzien vorgezogen. Bei der Mehrfarben-Analyse ist die korrekte Durchführung des Farbausgleichs von besonders hoher Bedeutung.

<p>References/ Références/ Literatur</p>
<ol style="list-style-type: none">Johnson A, Olofsson T. Flow cytometric clonal excess analysis of peripheral blood, routine handling, and pitfalls in interpretation. Cytometry 1993;14:188-95. Cartron G, Linassier C, Bremond JL, Desablens B, Georget MT, Fimbel B, et al. CD5 negative B-cell chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological features of 42 cases. Leuk Lymphoma 1998;31:209-16. Gandini D, Lanza F, Latorraca A, Levato F, Del Senno L, Castoldi G. Immunophenotypic and genotypic characterization of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients from Northern Italy. Haematologica 1993;78:18-24. Leers MPG, Theunissen PHMH, Ramaekers FCS, Schutte B, Nap M. Clonality assessment of lymphoproliferative disorders by multiparameter flow cytometry of paraffin-embedded tissue: an additional diagnostic tool in surgical pathology. Hum Pathol 2000;31:422-7.

<p>Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole</p>		
<p>REF</p> <p>Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer</p>	<p> Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	<p> Use by Utiliser jusque Verwendbar bis</p>
<p>IVD</p> <p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum</p>	<p> Keep away from sunlight (consult storage section) Conservér à l'écart du soleil (se reporter à la section conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)</p>	<p> Manufacturer Fabricant Hersteller</p>
<p> Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	<p>LOT</p> <p>Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung</p>	

(103460-002)	FR481/EFG/MTH/11.03.05 p. 4/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	