

**MultiMix™**  
**Dual-Colour Reagent**  
**Anti-Human CD5/FITC**  
**Anti-Human CD20/RPE**

**Code No./ Code-Nr. FR729**

**ENGLISH**

**Intended use** For in vitro diagnostic use.  
 FR729 is intended for use in flow cytometry. FR729 allows simultaneous detection and enumeration of CD5+ cells and CD20+ cells. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

**Introduction** CD5 is present on all mature T cells and most thymocytes. It is also expressed on a small subpopulation of normal B cells. The majority of T-cell malignancies (76%) express CD5, and almost 85% of T-cell acute lymphoblastic leukaemias are CD5 positive (1).  
 Further, CD5 is expressed in some B-cell derived lymphoproliferative disorders, notably chronic lymphocytic leukaemia (CLL) (>90%) (1, 2), and centrocytic leukaemia (3).

CD20 can be considered a pan-B cell antigen, as it is expressed on the surface of all mature B lymphocytes but not in secreting plasma cells (4). CD20 is expressed early during pre-B cell development, presumably just before the expression of cytoplasmic  $\mu$ -chains, and it persists until plasma cell differentiation (5). A small subset of T cells expresses low levels of CD20 (6). CD20 is expressed in acute lymphoblastic leukaemia, B-cell chronic lymphocytic leukaemia, hairy cell leukaemia and Burkitt's lymphoma (7).

**Reagent provided** FR729 comprises the following two, carefully matched, fluorescent antibodies:  
 Monoclonal Mouse Anti-Human CD5, Clone DK23, conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC).  
 Monoclonal Mouse Anti-Human CD20, Clone B-Ly1, conjugated with R-phycoerythrin (RPE).  
 The two conjugates in FR729 have been produced from purified monoclonal mouse antibodies of isotype IgG1, kappa. FR729 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  $\mu$ L of conjugate for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood).

Antibody Code No.	Fluorochrome	Control Reagent Code No.
FR729	FITC and RPE	X0932

**Specificity** The specificity of Anti-CD5, DK23, is equivalent to that of the CD5-clustered antibody Leu-1 (3).  
 Anti-CD20, B-Ly1, was included in the Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with CD20 (5). Cross-blocking studies indicate that a majority of antibodies in the CD20 cluster studied at the above workshop defines a single epitope (8).

**Precautions**

1. For professional users.
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.
3. 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**

1. Transfer 100  $\mu$ L of anticoagulated (EDTA) blood to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube.
2. Add 10  $\mu$ L of FR729 and mix gently by using a vortex mixer.
3. Incubate the tube in the dark at 2-8 °C for 30 minutes or at room temperature (20-25 °C) for 15-30 minutes.
4. Add 100  $\mu$ L of Uti-Lyse™ Reagent A (Dako 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.
5. Add 1 mL of Uti-Lyse™ Reagent B (Dako 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.
6. Centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50  $\mu$ L of fluid in the tube.
7. Add 2 mL of PBS (Dako code No. S3024) to the tube and resuspend the cells by using a vortex mixer.
8. Repeat step 6.
9. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL PBS.

10. 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 2: 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 isotypes and fluorochromes of the conjugated antibody reagent. The recommended Dual-Colour Control Reagent for FR729 is Dako code No. X0932.

Steps 4 and 5: 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 Dako EasyLyse™, code No. S2364, the PBS in step 9 should contain 1% paraformaldehyde unless the sample is analysed within the time frame recommended for the lysing reagent.

Step 10: 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.

## DEUTSCH

#### Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

FR729 ist für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. FR729 ermöglicht den Nachweis und die gleichzeitige Zählung von CD5+- und CD20+-Zellen. Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

#### Einleitung

Das CD5-Antigen liegt auf allen reifen T-Zellen und auf den meisten Thymozyten vor. Es wird ebenfalls auf einer kleinen Untergruppe normaler B-Zellen exprimiert. Die Mehrzahl aller T-Zell-Malignitäten (76 %) exprimieren CD5 und fast 85 % aller T-Zell-ALL sind CD5-positiv (1).

Außerdem wird CD5 bei einigen auf die B-Zelllinie zurückgehenden lymphoproliferativen Erkrankungen, insbesondere bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) (>90 %) (1, 2) und der zentrozytischen Leukämie exprimiert (3).

CD20 kann als ein pan-B-Lymphozytenantigen angesehen werden, da es auf der Oberfläche aller reifen B-Lymphozyten, nicht jedoch in sekretierenden Plasmazellen exprimiert wird (4). CD20 wird frühzeitig in der Entwicklung der Prä-B-Zellen exprimiert, vermutlich unmittelbar vor der Expression zytoplasmatischer  $\mu$ -Ketten und es persistiert bis hin zum Stadium der Plasmazelldifferenzierung (3). Eine kleine Untergruppe von T-Zellen exprimiert niedrige Konzentrationen von CD20 (6). CD20 wird exprimiert bei akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie (BCLL), Haarzellenleukämie und Burkitt-Lymphom(7).

#### Geliefertes Reagenz

FR729 umfasst die folgenden zwei, sorgfältig aufeinander abgestimmten Fluoreszenz-Antikörper:

Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, Clone DK23, konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat-Isomer 1 (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD20, Clone B-Ly1, konjugiert mit R-Phycoerythrin (RPE).

Die beiden in FR729 enthaltenen Konjugate wurden aus gereinigten monoklonalen Maus-Antikörpern des Isotyps IgG1, Kappa, produziert. FR729 liegt vor in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/L  $\text{NaN}_3$ , pH 7,2. Jede Flasche ist ausreichend für 50 Tests (10  $\mu\text{L}$  des Konjugats sind für bis  $10^6$  Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Kontrollreagenz Code-Nr.
FR729	FITC und RPE	X0932

#### Spezifität

Die Spezifität von Anti-CD5, DK23, ist derjenigen der CD5-Antikörpergruppe Leu-1 äquivalent (3).

Anti-CD20, B-Ly1, wurde Kontext des „Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ aufgenommen und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit CD20 (5). Kreuzblockierungsstudien deuten darauf hin, dass die Mehrzahl der zur CD20-Gruppe gehörenden Antikörper, die während des genannten Workshops untersucht wurden, ein einziges Epitop definieren (8).

#### Hinweise und

#### Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid ( $\text{NaN}_3$ ), 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 Produktetikett 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

1. 100 µL antikoaguliertes (EDTA) Blut in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
2. 10 µL FR729 dazugeben und vorsichtig mit einem Vortexer mischen.
3. 30 Minuten im Dunkeln bei 2–8 °C oder 15–30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.
4. 100 µL Uti-Lyse™ Reagent A (Dako Code-Nr. S3325) dazugeben und vorsichtig mit einem Vortexer mischen. Das Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
5. 1 µL Uti-Lyse™ Reagent B (Dako Code-Nr. S3325) dazugeben und vorsichtig mit einem Vortexer mischen. Das Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
6. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
7. 2 mL PBS (Dako Code-Nr. S3024) dazugeben und die Zellen mit einem Vortexer resuspendieren.
8. Schritt 6 wiederholen.
9. Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z.B. 0,3 mL PBS, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
10. 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 2: 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 den Isotypen und Fluorochromen des konjugierten Antikörperreagenz entsprechen. Für FR729 wird Dako Code-Nr. X0932 als zweifarbige Kontrollreagenz empfohlen.

Schritte 4 und 5: Falls ein anderes Zell-Lysereagenz verwendet wird, bitte die Empfehlungen für dieses Reagenz befolgen. Falls das alternative Lysereagenz kein Fixiermittel wie Dako EasyLyse™, Code-Nr. S2364 enthält, sollte die PBS in Schritt 9 1% Paraformaldehyd enthalten, außer wenn die Probe innerhalb des für das Lysereagenz empfohlenen Zeitrahmens analysiert wird.

Schritt 10: 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.

---

## References/ Literatur

1. Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. London: Oxford University Press; 1999. p. 51-2.
2. Lozano F, Simarro M, Calvo J. CD Guide. CD5. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1112-3.
3. Stein H, Lennert K, Feller AC, Mason DY. Immunohistological analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunological categories. *Adv Cancer Res* 1984;42:67-147.
4. Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology; London: Oxford University Press; 1999. p. 69-70.
5. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B3. B-cell antigens: CD20. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 46-8.
6. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry* 1993;14:196-204.
7. Pezzutto A, Behm F, Callard RE, Clark EA, Genetet N, Goodall AH, et al. B22.3. Flow cytometry analysis of the B-cell blind panel: joint report. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 165-74.
8. Tedder TF, Penta A. B3.1. Structure of the CD20 antigen and gene of human and mouse B-cells: use of transfected cell lines to examine the Workshop panel of antibodies. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 48-50.

Explanation of symbols / Erläuterung der Symbole

 <p>Catalogue number Katalognummer</p>	 <p>Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Use by Verwendbar bis</p>
 <p>In vitro diagnostic medical device In-vitro-Diagnostikum</p>	 <p>Keep away from sunlight (consult storage section) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)</p>	 <p>Manufacturer Hersteller</p>
 <p>Consult instructions for use Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Batch code Chargenbezeichnung</p>	 <p>Authorized representative in the European Community Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft</p>



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
No. 1 Yishun Avenue 7  
Singapore, 768923  
Tel. +44 161 492 7050  
www.agilent.com

Revision / Revision 2020.11