

MultiMix™
Dual-Colour Reagent
Anti-Human CD5/FITC
Anti-Human CD19/RPE
Code No./ Code/ Code-Nr. FR882

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. FR882 is intended for use in flow cytometry. Antibodies to CD5 and CD19 are considered essential for the initial evaluation of acute and chronic lymphoproliferative disorders as well as acute leukaemias (1). 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	FR882 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 CD19, Clone HD37, conjugated with R-phycoerythrin (RPE). The two conjugates in FR882 have been produced from purified monoclonal mouse antibodies of isotype IgG1, kappa. FR882 is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN ₃ , pH 7.2. Each vial contains 50 tests (10 µL of conjugate for up to 10 ⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).
Specificity	The specificity of Anti-CD5, DK23, is equivalent to that of the CD5-clustered antibody Leu-1 (2). In chronic leukaemia and myeloma, Anti-CD5, DK23, has been shown to label 4/4 (100%) T-cell chronic lymphocytic leukaemias, 2/2 (100%) T-cell prolymphocytic leukaemias, 36/39 (92%) B-cell chronic lymphocytic leukaemias, 5/6 (83%) B-cell prolymphocytic leukaemias, 0/14 (0%) hairy cell leukaemias, and 0/25 (0%) myelomas (3). 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 (4, 5). 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 (5).
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), 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 µL of anticoagulated (EDTA) blood to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube. 2. Add 10 µL of FR882 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 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. 5. 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. 6. 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. 7. Add 2 mL of PBS (DakoCytomation 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 FR882 is DakoCytomation 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 DakoCytomation 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.

FRANÇAIS	
Intérêt	Pour diagnostic <i>in vitro</i> . FR882 est destiné pour un usage en cytométrie en flux. Les anticorps aux CD5 et CD19 sont considérés essentiels pour l'évaluation initiale des troubles lymphoprolifératifs aigus et chroniques aussi bien que les leucémies aiguës(1). 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	FR882 comprend les deux anticorps fluorescents ci-dessous qui ont été soigneusement associés : Monoclonal Mouse Anti-Human CD5, Clone DK23, conjugué avec l'isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, conjugué avec R-phycoérythrine (RPE). Les deux conjugués de FR882 ont été produits à partir d'anticorps monoclonaux de souris purifiés, d'isotype IgG1, kappa. FR882 est fourni à l'état liquide en tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/l de NaN ₃ , pH 7,2. Chaque flacon contient 50 tests (10 µl de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10 ⁶ de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain)
Spécificité	La spécificité de l'Anti-CD5, DK23, est équivalente à celle de l'anticorps groupé en CD5, Leu-1 (2). Dans les leucémies chroniques et le myélome, Anti-CD5, DK23, a été mis en évidence en marquant 4/4 (100%) de leucémies lymphocytiques à cellules T chroniques, 2/2 (100%) de leucémies prolymphocytiques à cellules T, 36/39 (92%) de leucémies lymphocytiques à cellules B chroniques, 5/6 (83%) de leucémies prolymphocytiques à cellules B, 0/14 (0%) de leucémies à cellules tricholeucocytaires, et 0/25 (0%) de myélomes (3). Le HD37, anti-CD19, a été intégré au cours des "Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens", et les études réalisées par de nombreux laboratoires ont confirmé sa réactivité vis-à-vis du CD19 (4, 5). 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 réactions 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 hématopoïétique humain et ne réagissait pas avec les cellules non hématopoïétiques, par exemple les cellules du tissu rénal, hépatique, mammaire ou pulmonaire (5).
Précautions d'emploi	1. Pour utilisateurs professionnels. 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN ₃), 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. 3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
Stockage	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.
Procédure de coloration	1. Transférer 100 µL de sang non coagulé (EDTA) dans un tube à essai en polystyrène de 12 mm x 75 mm. 2. Ajouter 10 µL de FR882 et mélanger doucement à l'aide d'un vortex. 3. 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. 4. 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. 5. 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. 6. 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. 7. Ajouter 2 mL de PBS (réf. DakoCytomation S3024) au tube et remettre les cellules en suspension à l'aide d'un vortex. 8. Répéter l'étape 6. 9. Remettre les cellules en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de PBS. 10. Analyser 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 2 : 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 aux isotypes et aux fluorochromes du réactif anticorps conjugué. Le réactif de contrôle bicolore recommandé pour FR882 est DakoCytomation réf. X0932. Étapes 4 et 5 : 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 9 doit contenir 1 % de paraformaldéhyde sauf si l'échantillon est analysé dans les délais recommandés pour le réactif de lyse. Étape 10 : 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.

DEUTSCH

Zweckbestimmung Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.
FR882 ist für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. Antikörper gegen CD5 und CD19 werden als ausschlaggebend für die initiale Beurteilung von akuten und chronischen lymphoproliferativen Entgleisungen ebenso wie von akuten Leukämien angesehen (1). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

Geliefertes Reagenz FR882 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 CD19, Clone HD37, konjugiert mit R-Phycoerythrin (RPE).
Die beiden in FR882 enthaltenen Konjugate wurden aus gereinigten monoklonalen Maus-Antikörpern des Isotyps IgG1, Kappa, produziert. FR882 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 10⁶ Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Spezifität Die Spezifität des Anti-CD5, DK23, ist derjenigen der CD5-Antikörpergruppe Leu-1 äquivalent (2). Bei chronischen Leukämien und Myelomen konnte Anti-CD5, DK23, 4/4 (100 %) der T-Zell-CLL, 2/2 (100 %) der T-Zell-Prolymphozytenleukämien, 36/39 (92 %) der B-Zell-CLL, 5/6 (83 %) der B-Zell-Prolymphozytenleukämien, 0/14 (0 %) der Haarzell-Leukämien und 0/25 (0 %) der Myelome markieren (3).
Anti-CD19, HD37, wurde im Kontext der „Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Confernces on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ aufgenommen und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit CD19 (4, 5). Anti-CD19, HD37, markiert menschliche B-Zellen im peripheren Blut, im Knochenmark und in anderen Geweben. Außerdem erbrachten lymphoproliferative Entgleisungen der B-Zellen positive Reaktionen mit dem Antikörper, wie z. B. Akute Lymphatische Leukämie (ALL), Chronische Lymphatische Leukämie, Haarzell-Leukämie, Lymphoblastisches Lymphom (vom Burkitt-Typ), zentroblastisches-zentrozytisches Lymphom und diffuses Non-Hodgkin Lymphom. Der Antikörper reagierte nicht mit anderen Zellen des menschlichen hämatopoetischen Systems und reagierte nicht mit nicht hämatopoetischen Zellen, z. B. des Nieren-, Leber-, Brust- oder Lungengewebes (5).

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- 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.
- 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.

Färbeverfahren

- 100 µL antikoaguliertes (EDTA) Blut in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
- 10 µL FR882 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 übriglassen.
- 2 mL PBS (DakoCytomation Code-Nr. S3024) dazugeben und die Zellen mit einem Vortexer resuspendieren.
- Schritt 6 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 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 FR882 wird DakoCytomation Code-Nr. X0932 als zweifarbiges 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 DakoCytomation 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/ Références/ Literatur

- Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001;46:23-7.
- 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.
- Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet 1986;i:761-5.
- Nadler LM. B cell/leukemia panel workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. Leukocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume 2. p. 3-43.
- Mason DY, Ladyman H, Gatter KC. Immunohistochemical analysis of monoclonal anti-B cell antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. Leukocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume 2. p. 245-55.

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	