

## Monoclonal Mouse Anti-Human CD33, Clone WM-54

Code No./ Code/ Code-Nr. **F 0832**      **FITC-Conjugated**  
 Code No./ Code/ Code-Nr. **R 0745**      **RPE-Conjugated**

ENGLISH										
<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use. F 0832 and R 0745 are intended for use in flow cytometry. Anti-CD33 antibody is considered essential for the initial evaluation of acute myeloid leukaemia (AML) together with a panel of other antibodies (1, 2). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.									
<b>Synonym for antigen</b>	gp67, siglec-3 (3, 5).									
<b>Introduction</b>	CD33 is a member of the siglec family (sialic acid binding immunoglobulin-like lectins) referred to as Siglec-3 (5). It is the smallest member of the siglec family having a molecular weight of 67 kDa (4). CD33 mediates protein-carbohydrate cellular interactions in addition to protein-protein recognition (5). The CD33 gene is located on chromosome 19 (4). CD33 is expressed by subsets of monocytes and neutrophils. Committed hemopoietic progenitors, including multipotential stem cells (CFU-GEMM) and precursors of granulocytes and macrophages (CFU-GM) and early erythroid progenitors (BFU-E) express CD33 (3, 4). The antigen has been found on the cell surface of leukaemic blasts from the vast majority of cases of AML, including megakaryoblastic, but not erythroblastic variants. Leukaemic lymphoblasts do not show any expression of CD33 (1-4, 6).									
<b>Reagent provided</b>	The Anti-CD33 conjugates, F 0832 and R 0745, 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 <sub>3</sub> , pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 µL of conjugate for up to 10 <sup>6</sup> U937 cells). <u>Isotype:</u> IgG1, 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 0832</td> <td>FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)</td> <td>X 0927</td> </tr> <tr> <td>R 0745</td> <td>RPE (R-Phycoerythrin)</td> <td>X 0928</td> </tr> </tbody> </table>	Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.	F 0832	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927	R 0745	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928
Antibody Code No.	Fluorochrome	Negative Control Code No.								
F 0832	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X 0927								
R 0745	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928								
<b>Immunogen</b>	Leukaemic cells from a patient with AML (6).									
<b>Specificity</b>	Anti-CD33, WM-54, was included in the Fourth International Workshop and Conference on Leukocyte Cell Differentiation Antigens and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with the CD33 antigen (3). Anti-CD33, WM-54, reacts with cells of the monocyte-macrophage lineage and granulocyte progenitors (3). The antibody also shows a faint to weak reactivity with mature granulocytes (6). The antibody does not react with erythrocytes, platelets or lymphoid cells (6). Bone marrow progenitors CFU-GM, CFU-Mix and BFU-E demonstrate positive staining with Anti-CD33, WM-54 (6). In AML, Anti-CD33, WM-54, has been shown to label 14/21 cases (6). In chronic myeloid leukaemia with myeloid blast crisis Anti-CD33, WM-54, labelled 3/3 cases (6). In common acute lymphoblastic leukaemia Anti-CD33, WM-54, has been shown to label 1/8 cases (6).									
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>For professional users.</li> <li>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.</li> <li>As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li> </ol>									
<b>Storage</b>	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.									
<b>Staining procedure</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Collect venous blood into a test tube containing an anticoagulant.</li> <li>Isolate mononuclear cells by centrifugation on a separation medium. Alternatively, lyse the red cells after step 6.</li> <li>Wash the mononuclear cells twice with RPMI 1640 or PBS, pH 7.2-7.4.</li> <li>Mix 100 µL cell suspension with 10 µL fluorochrome-conjugated Anti-CD33.</li> <li>Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).</li> <li>Incubate in the dark at 4 °C for 30 minutes.</li> <li>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.</li> <li>Analyse on a flow cytometer.</li> </ol>									

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.

**Product-specific limitations** The fluorescence intensity of the antibody is reduced by the addition of 1% paraformaldehyde.

## FRANÇAIS

**Intérêt** Pour diagnostic *in vitro*.  
F 0832 et R 0745 sont destinés pour un usage en cytométrie en flux. L'anticorps anti-CD33, avec un panel d'autres anticorps, est considéré comme un élément essentiel de l'évaluation initiale des leucémies myéloblastiques aiguës (AML) (1,2). 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.

**Synonyme pour l'antigène** gp67, siglec-£ (3, 5).

**Introduction** Le CD33 fait partie de la famille Siglec (lectines de type immunoglobulines fixant l'acide sialique) dont elle est le membre Siglec-3 (5). Elle constitue le plus petit membre de la famille Siglec avec un poids moléculaire de 67 kDa (4). Outre le processus de reconnaissance de protéine à protéine, le CD33 favorise les interactions cellulaires protéines-hydrates de carbone (5). Le gène du CD33 est situé sur le chromosome 19 (4).

Le CD33 est exprimé par des sous-groupes de monocytes et de neutrophiles. Les cellules souches hématopoïétiques déterminées, parmi lesquelles les cellules souches pluripotentes (CFU-GEMM) et les précurseurs des granulocytes et des macrophages (CFU-GM), ainsi que les cellules souches érythroïdes précoces (BFU-E) expriment le CD33 (3, 4). L'antigène a été observé à la surface cellulaire des blastes leucémiques dans une grande majorité des cas d'AML, y compris les leucémies mégacaryoblastiques, mais pas chez les variants érythroblastiques. Les lymphoblastes leucémiques ne présentent aucune expression du CD33 (1-4, 6).

**Réactif fourni** Les conjugués anti-CD33, F 0832 et R 0745, ont été obtenus à partir d'un anticorps monoclonal purifié de souris. Les conjugués sont fournis à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/l de  $\text{NaN}_3$ , à 7,2 de pH. Chaque flacon permet de réaliser 100 analyses (10 µl de conjugué pouvant traiter jusqu'à  $10^6$  U937 de leucocytes provenant de sang périphérique normal)

Isotype: IgG1, kappa. Concentration du conjugué mg/l: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Code de l'anticorps	Fluor	Code du Contrôle Négatif
F 0832	FITC (Isomère 1 d'isothiocyanate de fluorescéine)	X 0927
R 0745	RPE (R-Phycoérythrine)	X 0928

**Immunogène** Cellules leucémiques provenant de patients atteints d'AML (6).

**Spécificité** Le WM-54, anti-CD33, a été intégré au cours du « 4<sup>th</sup> International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens », et les études réalisées par de nombreux laboratoires ont confirmé sa réactivité vis-à-vis de l'antigène CD33 (3).

Anti-CD33, WM-54 montre une réaction aux cellules de la lignée des monocytes-macrophages et les cellules souches des granulocytes (3). L'anticorps a également montré une réactivité vague à faible vis-à-vis des granulocytes matures (6). L'anticorps ne montre pas de réaction aux érythrocytes, les plaquettes ou les cellules lymphoïdes (6). Les cellules souches de la moelle osseuse, CFU-GM, CFU-Mix and BFU-E, présentent un marquage positif à l'anti-CD33, WM-54 (6).

Le WM-54, anti-CD33, a marqué 14 cas d'AML sur 21 (6). Le WM-54, anti-CD33, a marqué 3 cas de leucémie myéloïde chronique avec crise blastique myéloïde sur 3 (6). Le WM-54, anti-CD33, a marqué 1 cas de leucémie lymphoblastique aiguë sur 8 (6).

**Précautions d'emploi**

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), un composé 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 d'immunomarquage**

1. Prélever le sang veineux dans un tube à essais contenant un anticoagulant.
2. Isoler les cellules mononucléaires par centrifugation dans un milieu de séparation. Sinon, lyser les globules rouges après l'étape 6.
3. Laver les cellules mononucléaires deux fois avec du RPMI 1640 ou du PBS, à 7,2-7,4 de pH.
4. Mélanger 100 µl de la suspension cellulaire avec 10 µl d'Anti-CD33 conjugué au fluorochrome.

5. Utiliser un anticorps monoclonal non-réactif du même isotype, conjugué au même fluorochrome, en tant que contrôle négatif (voir tableau).
6. Laisser incuber à l'obscurité, à 4 °C, pendant 30 minutes.
7. 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 (fixateur) dans du PBS 0,01 mol/l, à pH 7,4.
8. Analyser sur un cytomètre en flux.

Il est recommandé d'inclure un contrôle positif et négatif adéquats à chaque technique pour contrôler le réactif et la préparation. Noter que les conjugués fluorochromes sont sensibles à la lumière, et les échantillons doivent être protégés de cette dernière au cours de la procédure d'immunomarquage et jusqu'à l'analyse.

**Limitations spécifiques du produit**

L'intensité de la fluorescence de l'anticorps est réduite par l'addition de paraformaldéhyde à 1 %.

**DEUTSCH**

**Zweckbestimmung**

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

F 0832 und R 0745 sind für den durchflusszytometrischen Gebrauch bestimmt. Der Anti-CD33-Antikörper wird, zusammen mit einem Panel weiterer Antikörper, als wichtiges Instrument für die Initialbewertung von akuter myeloischer Leukämie (AML) angesehen (1, 2). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

**Synonyme Bezeichnung des Antigens**

gp67, Siglec-3 (3, 5).

**Einleitung**

CD33 gehört zu der Familie der Siglecs (sialic acid binding immunoglobulin-like lectins) und wird daher auch als Siglec-3 bezeichnet (5). Mit einem Molekulargewicht von 67 kDa ist es das kleinste Mitglied der Familie der Siglecs (4). CD33 vermittelt zelluläre Protein-Kohlehydrat-Interaktionen sowie Protein-Protein-Erkennung (5). Das CD33-Gen ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert (4).

CD33 wird von Untergruppen von Monozyten und Neutrophilen exprimiert. Darüber hinaus kommt es zu einer Expression von CD33 in „committed“ hämatopoetischen Progenitoren, wie etwa in pluripotenten Stammzellen (CFU-GEMM) und Vorläufern von Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) sowie in frühen erythroiden Progenitoren (BFU-E) (3, 4). Das Antigen wurde auf der Zelloberfläche von leukämischen Blasten der überwiegenden Fälle von AML nachgewiesen, einschließlich der Megakaryoblasten-Variante, nicht jedoch der Erythroblasten-Variante. Leukämische Lymphoblasten weisen hingegen keine CD33-Expression auf. (1-4, 6).

**Geliefertes Reagenz**

Die Anti-CD33 Konjugate F 0832 und R 0745 stammen von einem gereinigten monoklonalen Maus-Antikörper. Die Konjugate werden in einer gepufferten Lösung mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 15 mmol/l NaN<sub>3</sub>, pH 7,2, geliefert. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 µl des Konjugats sind ausreichend für bis 10<sup>6</sup> U937-Zellen).

Isotyp: IgG1, Kappa. Konjugat-Konzentration mg/l: Siehe Produktetikett.

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Negativkontrolle Code- Nr.
F 0832	FITC (Fluoresceinisothiocyanat-Isomer 1)	X 0927
R 0745	RPE (R-Phycoerythrin)	X 0928

**Immunogen**

Leukämische Zellen von einem Patienten mit AML (6).

**Spezifität**

Anti-CD33, WM-54, wurde Kontext des „Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ aufgenommen und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit dem CD33-Antigen (3).

Anti-CD33, WM-54, reagiert mit Zellen der Monozyten/Makrophagen-Entwicklungslinie und mit Granulozyten-Progenitoren (3). Des Weiteren ist eine geringe bis schwache Reaktivität des Antikörpers mit reifen Granulozyten zu beobachten (6). Hingegen reagiert der Antikörper nicht mit Erythrozyten, Thrombozyten oder lymphoiden Zellen (6). Die Knochenmark-Progenitoren CFU-GM, CFU-Mix und BFU-E weisen eine positive Färbung mit Anti-CD33, WM-54, auf (6).

Bei AML wurde mit Anti-CD-33, WM54, eine Markierung von 14/21 Fällen erzielt (6). Bei chronischer myeloischer Leukämie mit myeloblastischer Krise markierte Anti-CD33, WM-54, 3/3 Fälle (6). Bei der Akuten Lymphoblastischen Leukämie (ALL) markierte Anti-CD33, WM-54, nachweislich 1/8 Fälle (6).

**Hinweise und**

**Vorsichtsmaßnahmen**

1. Für geschultes Fachpersonal.

2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN<sub>3</sub>), 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.

**Lagerung**

Im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Produkt angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, 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 Anfärbung 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

1. Venöses Blut in ein Antikoagulans enthaltendes Probenröhrchen gewinnen.
2. Mononukleäre Zellen durch Zentrifugieren in einem Abtrennungsmidium isolieren Alternativ hierzu können die Erythrozyten im Anschluss an Schritt 6 aufgelöst werden.
3. Mononukleäre Zellen zweimal mit RPMI 1640 oder mit PBS, pH 7,2 – 7,4, waschen.
4. 100 µl der Zellsuspension mit 10 µl des fluorochromkonjugierten Anti-CD33 mischen.
5. Als Negativkontrolle einen nicht reaktiven, monoklonalen Antikörper des gleichen Isotyps, konjugiert an dasselbe Fluorochrom, verwenden (s. Tabelle).
6. Im Dunkeln bei 4 °C 30 Minuten lang inkubieren.
7. 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 7,4, resuspendieren.
8. Im Durchflusszytometer analysieren.

Es wird empfohlen, eine geeignete Positiv- und Negativkontrolle für jede Durchführung der Reagenz- und Präparationsprüfung mitzuführen. Es ist zu beachten, dass Fluoreszenzkonjugate lichtempfindlich sind und dass die Proben während des Färbevorgangs und bis zur Durchführung der Analyse vor Licht geschützt werden müssen.










#### Produktspezifische Beschränkungen


Die Fluoreszenzintensität des Antikörpers wird durch die Zugabe von 1 %igem Paraformaldehyd reduziert.

#### References/ Références/ Literatur

1. van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editors. Leukemia. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company; 1996. p. 83-130.
2. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). Blood 2001;97:3574-80.
3. Peiper SC, Leboeuf RD, Hughes CB, Prasthofer EF, Borowitz MJ, Dewutter-Dambuyant C, et al. M6.1. Report on the CD33 cluster workshop: biochemical and genetic characterization of gp67. 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 on Human Leucocyte Differentiation Antigens; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 814-6.
4. Peiper SC, Guo HH. MC6. CD33 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyet 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. 972-4.
5. Crocker PR, Cornish A, Floyd H, Jones C, Nicoll G, Zhang J. AS6.1. Siglecs-an emerging family of sialic acid binding receptors of the immunoglobulin superfamily. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 31-3.
6. Favaloro EJ, Bradstock KF, Kabral A, Grimsley P, Berndt MC. Characterization of monoclonal antibodies to the human myeloid-differentiation antigen "gp67" (CD-33). Disease Markers 1987;5:215-25.

#### Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 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	 Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

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