

Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloperoxidase/APC, Clone MPO-7
Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloperoxidase/FITC, Clone MPO-7
Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloperoxidase/RPE, Clone MPO-7
Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloperoxidase/PerCP-Cy5.5, Clone MPO-7

Code C7246
Code F0714
Code R7209
Code PR704

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. C7246, F0714, R7209 and PR704 are intended for use in flow cytometry. The antibody labels myeloperoxidase-expressing cells in normal and neoplastic tissue (4). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.
Summary and explanation	Human myeloperoxidase (MPO) is a 150 kDa tetrameric polypeptide consisting of 2 covalently linked subunits of approximately 59 kDa and 2 subunits of approximately 13 kDa. MPO is a lysosomal enzyme present abundantly in the azurophilic granules of neutrophils and at lower concentration in the granules of monocytes. MPO is involved in the microbicidal action of these cells (1).
Reagent provided	The Anti-MPO conjugates, C7246, F0714, R7209 and PR704, 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 ₃ , pH 7.2. Each vial contains conjugate for 100 tests of up to 10 ⁶ leucocytes from normal human peripheral blood. See table 1 for volume of conjugate per test. <u>Isotype:</u> IgG1, kappa. <u>Conjugate concentration:</u> See label on vial.

Table 1

Antibody Dako Code	Fluorochrome	Volume of conjugate per test	Isotype Reagent Dako Code
F0714	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	10 µL	X0927
R7209	RPE (R-Phycoerythrin)	10 µL	X0928
C7246	APC (Allophycocyanin)	10 µL	X0968
PR704	PerCP-Cy5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein Cyanine 5.5)	5 µL	No Dako Code*

*It is recommended to use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype and conjugated to PerCP-Cy5.5.

Immunogen	Human MPO isolated from CML cells (2).
Specificity	Anti-MPO, MPO-7, strongly labels the cytoplasm of neutrophil granulocytes in peripheral blood. Monocytes are weakly positive while lymphocytes are unreactive. In bone marrow, cells of the granulocyte series are labelled. Anti-MPO, MPO-7, also labels the human promyelocyte cell line HL-60, while other myeloid cell lines such as K-562 and KG-1 are consistently unreactive (3). In acute myeloid leukemia, anti-MPO, MPO-7, is a useful reagent (4) since it labels a large proportion of cases (3, 5).
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> For in vitro diagnostic use. 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. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
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 Dako Technical Support.
Staining procedure	<ol style="list-style-type: none"> Transfer 50 µL (up to 10⁶ cells) of the cell suspension to be analysed (whole blood, bone marrow or mononuclear cells) to a test tube. Add 100 µL Dako IntraStain Reagent A (Fixation), Code K2311. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension. Incubate at room temperature for 15 minutes. Add 2 mL PBS and mix gently by using a vortex mixer. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 µL of fluid. Mix thoroughly by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension and add 100 µL Dako IntraStain Reagent B (Permeabilization), Code K2311. Add the volume of anti-MPO conjugate stated in table 1. Mix gently by using a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension.

7. Use a non-reactive monoclonal antibody of the same isotype, and conjugated with the same fluorochrome, as a negative control (see table).
8. Incubate in the dark at room temperature for 15 minutes.
9. Repeat steps 4 and 5.
10. Resuspend the pellet in an appropriate fluid for flow cytometric analysis, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
11. Analyse on a flow cytometer.

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.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour une utilisation diagnostique in vitro.

C7246, F0714, R7209 et PR704 sont destinés à être utilisés en cytométrie de flux. L'anticorps marque les cellules exprimant la myéloperoxydase dans les tissus sains et néoplasiques (4). Les résultats doivent être interprétés par un professionnel qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques.

Résumé et explication

La myéloperoxydase humaine (MPO) est un polypeptide tétramérique de 150 kDa se composant de 2 sous-unités liées entre elles par des liaisons covalentes d'environ 59 kDa et 2 sous-unités d'environ 13 kDa. La MPO est une enzyme lysosomale présente en abondance dans les granules azurophiles des neutrophiles et à une concentration inférieure dans les granules de monocytes. La MPO est impliquée dans l'action microbicide de ces cellules (1).

Réactifs fournis

Les conjugués anti-MPO, C7246, F0714, R7209 et PR704 ont été préparés à partir d'un anticorps monoclonal de souris purifié. Les conjugués sont fournis sous forme liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 15 mmol/l d'azide de sodium (NaN_3) d'un pH de 7,2. Chaque flacon contient du conjugué pour 100 tests de 10^6 leucocytes au maximum à partir de sang périphérique humain sain. Voir le tableau 1 pour le volume de conjugué par test.

Isotype : IgG1, kappa. Concentration des conjugués : Voir l'étiquette sur le flacon.

Tableau 1

Réf. d'anticorps Dako	Fluorochrome	Volume de conjugué par test	Réf. de réactif d'isotype Dako
F0714	FITC (Isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine)	10 µL	X0927
R7209	RPE (R-Phycoérythrine)	10 µL	X0928
C7246	APC (allophycocyanine)	10 µL	X0968
PR704	PerCP-Cy5.5 (péridinine chlorophylle protéine-cyanine 5.5)	5 µL	Aucune réf. Dako*

* Il est recommandé d'utiliser un anticorps monoclonal non réactif du même isotype et conjugué à la PerCP-Cy5.5.

Immunogène

MPO humaine isolée des cellules de LMC (2).

Spécificité

L'anti-MPO, MPO-7, marque fortement le cytoplasme des granulocytes neutrophiles du sang périphérique. Les monocytes sont faiblement positifs alors que les lymphocytes ne présentent aucune réactivité. Dans la moelle osseuse, des cellules de la lignée granulocytaire sont marquées. L'anti-MPO, MPO-7, marque également la lignée cellulaire promyélocytaire humaine HL-60, alors que d'autres lignées cellulaires myéloïdes telles que K-562 et KG-1 ne présentent invariablement aucune réactivité (3). Dans la leucémie myéloïde aiguë, l'anti-MPO, MPO-7, est un réactif utile (4), car il marque une grande partie des cas (3, 5).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation

Conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Procédure de coloration

1. Transférer 50 µl (jusqu'à 10^6 cellules) de suspension cellulaire à analyser (sang total, moelle osseuse ou cellules mononucléées) dans un tube à essai.

2. Ajouter 100 µl de Dako IntraStain Reagent A (Fixation), réf. K2311. Mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur Vortex pour s'assurer que les cellules sont en suspension.
3. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
4. Ajouter 2 ml d'une solution saline de tampon phosphate (PBS) et mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur Vortex.
5. Centrifuger à 300 g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant. Laisser environ 50 µl de liquide.
6. Bien mélanger à l'aide d'un mélangeur Vortex pour s'assurer que les cellules sont bien en suspension et ajouter 100 µl de Dako IntraStain Reagent B (Permeabilization), réf. K2311. Ajouter le volume de conjugué anti-MPO tel qu'indiqué dans le tableau 1. Mélanger doucement à l'aide d'un mélangeur Vortex pour s'assurer que les cellules sont en suspension.
7. Utiliser un anticorps monoclonal non réactif de même isotype et conjugué avec le même fluorochrome comme contrôle négatif (voir le tableau).
8. Incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant 15 minutes.
9. Répéter les étapes 4 et 5.
10. Remettre le culot en suspension dans un liquide approprié pour l'analyse cytométrique en flux ; ex. : 0,3 ml à 1% de paraformaldéhyde (fixateur) dans 0,01 mol/l de PBS, d'un pH de 7,4.
11. Analyser à l'aide d'un cytomètre en flux.

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

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

C7246, F0714, R7209 und PR704 sind zur Verwendung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Der Antikörper markiert Myeloperoxidase-exprimierende Zellen in normalem und neoplastischem Gewebe (4). Die Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Experten unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten ausgewertet werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Humane Myeloperoxidase (MPO) ist ein tetrameres Polypeptid (150 kDa) aus zwei kovalent verbundenen Untereinheiten mit etwa 59 kDa und zwei Untereinheiten mit etwa 13 kDa. MPO ist ein lysosomales Enzym, das in großen Mengen in der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten und in geringen Mengen auch in der Granula von Monozyten vorkommt. MPO ist an der mikrobiziden Wirkung dieser Zellen beteiligt (1).

Geliefertes Reagenz

Die Anti-MPO-Konjugate C7246, F0714, R7209 und PR704 wurden aus einem gereinigten monoklonalen Mausantikörper hergestellt. Sie werden in flüssiger Form in einem Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2 geliefert. Jeder Behälter enthält Konjugat für 100 Tests für bis zu 10⁶ Leukozyten aus normalem humanem peripherem Blut. Die Konjugatmenge pro Test ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Isotyp: IgG1, kappa. Konjugatkonzentration: Siehe Behälteretikett.

Tabelle 1.

Antikörper – Dako Code-Nr.	Fluorochrom	Konjugatmenge pro Test	Isotyp-Reagenz – Dako Code-Nr.
F0714	FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat-Isomer 1)	10 µL	X0927
R7209	RPE (R-Phycoerythrin)	10 µL	X0928
C7246	APC (Allophycocyanin)	10 µL	X0968
PR704	PerCP-Cy5.5 (Peridinin-Chlorophyll-Protein-Zyanin 5.5)	5 µL	Keine Dako Code-Nr.*

*Es wird empfohlen, einen nicht reaktiven monoklonalen Antikörper desselben Isotyps zu verwenden, der mit PerCP-Cy5.5 konjugiert wurde.

Immunogen

Humanes MPO, isoliert aus CML-Zellen (2).

Spezifität

Anti-MPO, MPO-7 markiert stark das Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten in peripherem Blut. Monozyten sind schwach positiv, während Lymphozyten keine Reaktion aufweisen. Im Knochenmark werden von Granulozyten abstammende Zellen markiert. Anti-MPO, MPO-7 markiert auch die menschliche Promyelozyten-Zelllinie HL-60, während andere myeloische Zelllinien wie K-562 und KG-1 durchweg nicht reaktiv sind (3). Bei akuter myeloischer Leukämie ist Anti-MPO, MPO-7 ein hilfreiches Reagens (4), da es einen großen Teil der Fälle markiert (3, 5).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Nur für Fachpersonal bestimmt.
3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. 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 Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2-8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn eine 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 Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

Färbeverfahren










1. 50 µL (bis zu 10⁶ Zellen) der zu analysierenden Zellsuspension (Vollblut, Knochenmark oder mononukleare Zellen) in ein Teströhrchen geben.
2. 100 µL Dako IntraStain Reagent A (Fixation), Code-Nr. K2311, zugeben. Mit einem Vortex-Mischer vorsichtig mischen, um zu gewährleisten, dass die Zellen suspendiert sind.
3. Bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren.
4. 2 mL PBS zugeben und mit einem Vortex-Mischer vorsichtig mischen.
5. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren und anschließend den Überstand absaugen. Dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.
6. Vorsichtig mit einem Vortex-Mischer mischen, um zu gewährleisten, dass die Zellen suspendiert sind, und 100 µmL DakoCytomation IntraStain, Reagent B (Permeabilisation), Code-Nr. K2311, dazugeben. Die in Tabelle 1 angegebene Menge an Anti-MPO-Konjugat zugeben. Mit einem Vortex-Mischer vorsichtig mischen, um zu gewährleisten, dass die Zellen suspendiert sind.
7. Einen nicht reaktiven monoklonalen Antikörper desselben Isotyps, der auch mit demselben Fluorochrom konjugiert wurde, als Negativkontrolle verwenden (siehe Tabelle).
8. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren.
9. Schritte 4 und 5 wiederholen.
10. Das Pellet in einer geeigneten Flüssigkeit, z. B. 0.3 mL 1% Paraformaldehyd (Fixiermittel) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
11. Auf einem Durchflusszytometer analysieren.

Es wird empfohlen, als Kontrolle für das Reagenz und das Präparat bei jedem Testdurchlauf eine geeignete Positiv- und Negativkontrollprobe mitlaufen zu lassen. Bitte beachten, dass Fluorochrom-Konjugate lichtempfindlich sind und die Proben während des Färbeverfahrens und bis zur Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

References/ Références/ Literatur

1. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. Proc Assoc Am Physicians 1999;111:383-89.
2. Olsson I, Olofsson T, Odeberg H. Myeloperoxidase-mediated iodination in granulocytes. Scand J Haemat 1972;9:483-91.
3. Nakase K, Sartor M, Bradstock K. Detection of myeloperoxidase by flow cytometry in acute leukemia. Cytometry 1998;34:198-202.
4. Kappelmayer J, Gratama JW, Karázi É, Menéndez P, Ciudad J, Rivas R, et al. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a. Interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols. J Immunol Methods 2000;242:53-65.
5. Lanza F, Latorraca A, Moretti S, Castagnari B, Ferrari L, Castoldi G. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells. Cytometry 1997;30:134-44.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2°C - 8°C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'abri de la lumière (voir la section Conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 LOT Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung	 EC REP 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