

## MultiMix™

### Triple-Colour Reagent

#### Anti-Human Kappa Light Chains/FITC

#### Anti-Human Lambda Light Chains/RPE

#### Anti-Human CD19/RPE-Cy5

#### Code No./ Code/ Code-Nr. TC051

ENGLISH
---------

#### Intended use

For in vitro diagnostic use.

TC051 is intended for use in flow cytometry for simultaneous detection and enumeration of kappa light chains and lambda light chains on human B cells. 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). CD19 is the broadest lineage-specific surface marker for B cells and it is present on the surface of virtually all B lymphocytes, including early B progenitor cells (5). CD19 expression is maintained in B-lineage cells that have undergone neoplastic transformation (6). Antibodies to CD19 are considered essential for the initial evaluation of acute and chronic lymphoproliferative disorders (7). 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

TC051 comprises the following three, 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).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, conjugated with conjugated R-phycoerythrin-Cyanine 5 (RPE-Cy5).

The Anti-Kappa Light Chains conjugate has been produced from a F(ab')<sub>2</sub> fragment of affinity-isolated polyclonal rabbit antibody. The Anti-Lambda Light Chains conjugate has been produced from a F(ab')<sub>2</sub> fragment of affinity-isolated polyclonal rabbit antibody. The Anti-CD19 conjugate has been produced from a purified monoclonal mouse antibody. TC051 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 µL of conjugate for up to 10<sup>6</sup> leucocytes from normal human peripheral blood).

Antibody Code No.	Fluorochrome	Control Reagent Code No.
TC051	FITC, RPE and RPE-Cy5	X0957

#### 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.

Anti-CD19, Clone HD37: Hairy cell leukaemia cells.

#### 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 cytometric analysis of single suspensions from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples demonstrated that Anti-Lambda Light Chains labels reactive hyperplastic lymph nodes, 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.

**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 (8). 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 (8).

**TC051, Flow cytometry:** When TC051 is applied as described in the staining procedure, on lysed human whole blood, a specific staining of a part of the CD19 positive B lymphocytes is seen, within the expected range of kappa and lambda light chains expression.

#### Precautions

- For professional users.
- 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.
- 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.

#### Product-specific limitations

It has been observed that RPE-Cy5-conjugates may bind to monocytes, resulting in background staining (9).

#### 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 TC051 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.
- 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 Triple-Colour Control Reagent for TC051 is DakoCytomation code No. X0957.

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
----------

#### Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

TC051 est destiné pour un usage en cytométrie en flux pour la détection et la numération simultanées des chaînes légères kappa et lambda sur les lymphocytes B humains. En cytométrie en flux, les anticorps anti-chaînes légères kappa sont utiles pour la détermination des chaînes légères kappa de la surface cellulaire, de même les anticorps anti-chaînes légères lambda sont utiles pour la détermination des chaînes lambda légères de la surface cellulaire; et donc aussi, accompagné d'un panel d'anticorps, pour l'identification de la monoclonalité (excès clonal) dans les syndromes lymphoprolifératifs (1-4). Le CD19 est le marqueur de surface spécifique le plus général de la lignée cellulaire B, il est quasiment présent à la surface de tous les lymphocytes B, y compris les cellules souches B précoces (5). L'expression du CD19 est conservée dans les cellules de la lignée B ayant subi une transformation néoplasique (6). Les anticorps dirigés contre le CD19 sont considérés comme essentiels lors de l'évaluation initiale des troubles lymphoprolifératifs aigus et chroniques (7). 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

TC051 comporte les trois composants fluorescents suivants, soigneusement appariés:

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).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, clone HD37, conjugué avec la R-phycoérythrine-Cyanine 5 (RPE-Cy5).

Le conjugué anti-chaînes légères kappa a été produit à partir d'un fragment F(ab')<sub>2</sub> de l'anticorps polyclonal de lapin isolé par affinité. Le conjugué Chaînes Légères Anti-Lambda a été produit à partir d'un fragment F(ab')<sub>2</sub> isolé par affinité d'un anticorps polyclonal du lapin. Le conjugué Anti-CD19 a été produit à partir d'un anticorps purifié monoclonal de la souris.

TC051 est fourni à l'état liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub>, à 7,2 de pH. Chaque flacon contient 50 tests (10 µL de conjugué pouvant traiter jusqu'à 10<sup>6</sup> de leucocytes provenant de sang périphérique normal humain).

Code de l'anticorps	Fluor	Code du Réactif de contrôle
TC051	FITC, RPE et RPE-Cy5	X0957

#### Immunogène

Rabbit Anti-Human Lambda Light Chains : Les chaînes légères de type kappa des immunoglobulines polyclonales, isolées du plasma humain.

Chaînes Légères Lambda Anti-Humain de Lapin: Les chaînes légères de type lambda des immunoglobulines polyclonales, isolées du plasma humain.

Anti-CD19, Clone HD37: Cellules leucémiques tricholeucocytaires.

#### Spécificité

**Chaînes Légères Anti-Kappa** : Montre une réaction aux chaînes kappa libres ainsi qu'aux chaînes kappa des molécules d'immunoglobulines intactes. Sa spécificité a été déterminée de la manière décrite ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité d'immunoélectrophorèse croisée a été effectué avant la purification par affinité et la dégradation à la pepsine.

**Immuno-électrophorèse croisée** : Seuls des précipités liés à kappa apparaissent lorsque l'anticorps est testé pour du plasma humain. Marquage: Bleu de Coomassie.

**Cytométrie de flux** : Lorsque Anti-Kappa Light Chains est appliqué selon la procédure d'immunomarquage en combinaison avec Anti-CD19/RPE, HD37, sur du sang humain total lysé, un marquage 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.

**Chaînes Légères Anti-Lambda** : Montre une réaction aux chaînes lambda libres aussi bien qu'aux chaînes lambda de molécules d'immoglobulines intactes. Sa spécificité a été déterminée de la manière décrite ci-dessous. Pour obtenir une sensibilité maximum, le test de spécificité d'immunoélectrophorèse croisée a été effectué avant la purification par affinité et la dégradation à la pepsine.

**Immuno-électrophorèse croisée** : Seuls les précipités apparentés au lambda apparaissent lorsque l'anticorps est testé pour le plasma humain. Marquage: Bleu de Coomassie.

**Cytométrie de flux** : Lorsque Anti-Lambda Light Chains est appliqué selon la procédure d’immunomarquage en combinaison avec Anti-CD19/FITC, HD37, sur du sang humain total lysé, un marquage 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.

L’analyse en cytométrie en flux de suspensions simples obtenues à partir des échantillons de tissus inclus en paraffine, fixés au formol, a montré que l’anticorps anti-chaînes légères lambda marque les ganglions lymphatiques hyperplasiques réactifs, ainsi que le fait l’anticorps anti-chaînes légères kappa (10 cas sur 10). Dans les lymphomes non-Hodgkiniens, l’anticorps marquait 5/10 cas. Le reste des cas étaient positifs pour les chaînes légères kappa (4/10 cas) ou ne révélaiet aucune expression des chaînes légères (1/10 cas) (4).

L’analyse en cytométrie de flux de lymphocytes du sang périphérique a déterminé que Anti-Kappa Light Chains marque une proportion de leucémies lymphocytiques chroniques à lymphocytes-B. Ainsi, dans une étude de 121 cas (2), 37 étaient positifs pour kappa. Dans une autre étude de 165 cas (3), 97 étaient positifs pour kappa. Dans une autre étude de 165 cas (3), 97 étaient positifs pour kappa et 68 étaient positives pour lambda.

**Anti-CD19, HD37** : Etait inclu durant les Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens, et des études par plusieurs laboratoires ont mis en évidence sa réactivité avec CD19 (8). 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 réstions 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 hématopoiétique humain et ne réagissait pas avec les cellules non hématopoiétiques, par exemple les cellules du tissu rénal, hépatique, mammaire ou pulmonaire (8).

**TC051, Cytometrie en flux** : Quand le réactif TC051 est appliqué, comme décrit dans la procédure d’immunomarquage, sur du sang total humain lysé, un marquage spécifique d’une partie des lymphocytes B CD19 positifs est observée, à l’intérieur de l’intervalle attendu de l’expression des chaînes légères kappa et lambda.

**Précautions d’emploi**

- Pour utilisateurs professionnels.
- Ce produit contient de l’azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), 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.
- Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s’impose.

**Conservation**

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.

**Limitations spécifiques du produit**

Il a été observé que les conjugués RPE-Cy5 pouvaient se lier aux monocytes, ce qui se traduit par un marquage non spécifique (9).

**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.

- 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 TC051 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.
- 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 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 tricolore recommandé pour TC051 est DakoCytomation réf. X0957.

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><b>DEUTSCH</b></p>
-----------------------

**Zweckbestimmung**

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

TC051 ist zur Verwendung in der Durchflusszytometrie für die gleichzeitige Erfassung und Auszählung von Kappa- und Lambda-Leichtketten auf menschlichen B-Zellen 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). CD19 ist der am weitesten verbreitete abstammungsspezifische Marker für B-Zellen und ist auf der Oberfläche praktisch aller B-Lymphozyten, einschließlich früher B-Vorläuferzellen, vorhanden (5). Die CD19-Expression bleibt auch bei Zellen der B-Zelllinie aufrechterhalten, die eine neoplastische Transformation durchlaufen haben (6). Antikörper gegen CD19 werden als

(103518-002)	TC051/EFG/MTH/09.03.05 p. 3/5
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	

ausschlaggebend für die anfängliche Beurteilung von akuten und chronischen lymphoproliferativen Entgleisungen angesehen (7). Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.

**Geliefertes Reagenz**

TC051 beinhaltet die folgenden drei sorgfältig aufeinander abgestimmten fluoreszierenden 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.

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, konjugiert mit konjugiertem R-Phycoerythrin-Cyanin 5 (RPE-Cy5).

Das Anti-Kappa Light Chains-Konjugat wird aus einem F(ab')<sub>2</sub> –Fragment des affinitätsisolierten polyklonalen Kaninchenantikörpers hergestellt. Das Anti-Lambda Light Chains-Konjugat wird aus einem F(ab')<sub>2</sub> –Fragment des affinitätsisolierten polyklonalen Kaninchenantikörpers hergestellt. Anti-CD19-Konjugat wird aus einem gereinigten monoklonalen Mausantikörper hergestellt.

TC051 wird 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 50 Tests (10 µL des Konjugats sind für bis 10<sup>6</sup> Leukozyten aus normalem, menschlichem peripheren Blut ausreichend).

Antikörper Code-Nr.	Fluorochrom	Kontrollreagenz Code-Nr.
TC051	FITC, RPE und RPE-Cy5	X0957

**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.

Anti-CD19, Clone HD37: Haarzellenleukämie-Zellen.

**Spezifität**

**Anti-Lambda Light Chains**: Reagiert mit freien Kappa-Ketten sowie Kappa-Ketten in intakten Immunglobulinmolekülen. 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**: Reagieren mit freien Lambda-Ketten sowie Lambda-Ketten in intakten Immunglobulinmolekülen. 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 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.

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 testeten in einer Studie von 121 (2) Fällen 37 positiv auf Kappa und 17 waren positiv auf Lambda. In einer anderen Studie von 165 Fällen (3) testeten 97 Kappa-positiv und 68 waren Lambda-positiv .

**Anti-CD19, HD37**: Die Aufnahme erfolgte im Kontext der „Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ und Studien in einigen Laboratorien bestätigten seine Reaktivität mit CD19 (8). 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 (8).

**TC051, Durchflusszytometrie**: Bei Anwendung von TC051 (wie unter „Färbeprozedur“ beschrieben) auf lysiertem menschlichem Vollblut kann eine spezifische Färbung eines Teils der CD19-positiven Lymphozyten innerhalb des erwarteten Bereichs der Expression der Kappa- und Lambda- Leichtketten beobachtet werden.

**Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

- Für geschultes Fachpersonal.
- 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.
- Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handabungsverfahren 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.

**Produktspezifische Beschränkungen**

Die Bindung von RPE-Cy5-Konjugaten an Monozyten wurde beschrieben, wodurch eine Hintergrundfärbung möglich ist (9).

**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 Serumimmunoglobuline 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 übrigglassen.
- 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 TC051 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 übrigglassen.

(103518-002)	TC051/EFG/MTH/09.03.05 p. 4/5
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	

11. 2 mL PBS dazugeben und die Zellen mit einem Vortexer resuspendieren.
12. Schritt 10 wiederholen.
13. Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z.B. 0,3 mL PBS, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
14. 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 TC051 wird DakoCytomation Code-Nr. X0957 als dreifarbiges 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.

#### References/ Références/ Literatur

1. Johnson A, Olofsson T. Flow cytometric clonal excess analysis of peripheral blood, routine handling, and pitfalls in interpretation. *Cytometry* 1993;14:188-95.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Pezzutto A, Dörken B, Rabinovitch PS, Ledbetter JA, Moldenhauer G, Clark EA. CD19 monoclonal antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. *J Immunol* 1987;138:2793-9.
6. Sato S, Tedder TF. BC3. CD19 workshop panel report. 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. 133-5.
7. 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.
8. 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.
9. van Vugt MJ, van den Herik-Oudijk IE, van de Winkle JGJ. Binding of PE-CY5 conjugates to the human high-affinity receptor for IgG (CD64). *Blood* 1996;88:2358-61.

#### 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	