

MultiMix™**Triple-Colour Reagent
Anti-Human CD19/FITC
Anti-Human CD34/RPE
Anti-Human CD22/APC
Code No./ Code/ Code-Nr. TC689****ENGLISH****Intended use**

For in vitro diagnostic use.

TC689 is intended for use in flow cytometry. The reagent is intended for use in identification of CD19- and CD22-positive B cells and CD34-positive progenitor cells.

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 (1). CD19 expression is maintained in B-lineage cells that have undergone neoplastic transformation (2). Antibodies to CD19 are considered essential for the initial evaluation of acute and chronic lymphoproliferative disorders (3).

The CD34 antigen is present on human haematopoietic progenitor cells in bone marrow and blood. In contrast, the CD34 antigen is normally not detected on peripheral blood leucocytes and platelets (4). Approximately 60% of acute B-lymphoid leukaemias and 40% of acute myeloid leukaemias (AML), and 1% to 5% of acute T-lymphoid leukaemias express CD34 (4). Chronic lymphoid leukaemias, lymphomas and multiple myelomas have been found to be uniformly CD34 negative (4, 5).

The CD22 antigen is expressed on normal and neoplastic B-lymphocytes in samples of human peripheral blood and bone marrow. CD22 is present in neoplasms of B cell origin, including primitive lymphomas, which lack monoclonal surface immunoglobulin, and in most cases of common acute lymphoblastic leukaemia (6).

Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Reagent provided

TC689 comprises the following three matched fluorescent antibodies:

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD34, Clone BIRMA-K3, conjugated with R-phycoerythrin (RPE).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD22, Clone 4KB128, conjugated with allophycocyanin (APC).

The three conjugates in TC689 have been produced from purified monoclonal mouse antibodies of isotype IgG1, kappa. TC689 is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L Na₃N, pH 7.2. Each vial contains 50 tests (20 µL of conjugate for up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).

Specificity

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 (7, 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 (7, 8).

Anti-CD34, BIRMA-K3, was included in the Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with CD34 and the class III epitope (9). In flow cytometry the antibody labels KG-1a cells (a primitive myeloid leukaemia cell line, known to be CD34-positive) (10).

Anti-CD22, 4KB128, was included in the Third and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (11, 12), and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with the CD22 antigen. Anti-CD22, 4KB128, reacts with normal and neoplastic B cells and does not react with other haematopoietic cell types (11).

Precautions

1. For professional users.
2. 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.
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 reagent 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 20 µL of TC689 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 (Dako code No. S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
5. Add 1 mL of Uti-Lyse™ Reagent B (Dako code No. S3325) to the tube and mix gently by using a vortex mixer. Incubate the tube for 10 minutes at room temperature in the dark.
6. Centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 µL of fluid in the tube.
7. Add 2 mL of PBS (Dako code No. S3024) to the tube and resuspend the cells by using a vortex mixer.
8. Repeat step 6.
9. Resuspend the cells in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL PBS.
10. Analyse the sample on a flow cytometer or store it in the dark at 2-8 °C until analysis. Samples should be analysed within 24 hours after staining.

Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

Procedural notes

Step 1: It is optional to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control.

Step 2: The volume of conjugate recommended is a guideline only. Optimal staining conditions may vary depending on specimen and preparation method and should be determined by each individual laboratory.

It is optional to include a control reagent test tube. The control reagent should match the conjugated antibody reagent. The recommended Triple-Colour Control Reagent for TC689 is Dako code No. X0978.

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, e.g. Dako EasyLyse™, code No. S2364, the PBS in step 9 should contain 1% paraformaldehyde or be 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. The combination of FITC, RPE and APC is especially easy to work with since the emission spectra of these fluorochromes show minimum spectral overlap.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.

Le TC689 est destiné à être utilisé en cytométrie en flux. Le réactif est destiné à être utilisé pour l'identification des lymphocytes B CD19+ et CD22+ et des cellules progénitrices CD34+.

Le CD19 est le marqueur de surface le plus large spécifique à la lignée lymphocytaire B ; il est présent sur pratiquement tous les lymphocytes B, y compris les cellules progénitrices B précoces (1). L'expression du CD19 est préservée dans les cellules de la lignée B ayant subi une transformation néoplasique (2). Les anticorps dirigés contre le CD19 sont considérés comme essentiels à l'évaluation initiale des syndromes lymphoprolifératifs aigus et chroniques (3).

L'antigène CD34 est présent sur les cellules progénitrices hématopoïétiques humaines de la moelle osseuse et du sang. Par contre, l'antigène CD34 ne doit pas normalement être détecté sur les plaquettes et les leucocytes du sang périphérique (4). Environ 60% des leucémies lymphoïdes aiguës à lymphocytes B, 40% des leucémies myéloïdes aiguës (LAM) et 1 à 5% des leucémies lymphoïdes aiguës à lymphocytes T expriment le CD34 (4). Les leucémies lymphoïdes chroniques, les lymphomes et les myélomes multiples se sont avérés uniformément négatifs au CD34 (4, 5).

L'antigène CD22 est exprimé sur les lymphocytes B sains et néoplasiques dans des échantillons de sang périphérique et de moelle osseuse humains. Le CD22 est présent dans les néoplasmes d'origine lymphocytaire B, y compris les lymphomes primitifs, qui ne possèdent pas d'immunoglobulines de surface monoclonales, et dans la plupart des cas de leucémies aiguës lymphoblastiques courantes (6).

Les résultats doivent être interprétés par un pathologiste qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient ainsi que d'autres tests diagnostiques.

Réactifs fournis

Le TC689 comprend les trois anticorps fluorescents suivants :

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, conjugué à l'isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human CD34, Clone BIRMA-K3, conjugué à la R-phycoérythrine (RPE).

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human CD22, Clone 4KB128, conjugué à l'allophycocyanine (APC).

Les trois conjugués du TC689 ont été préparés à partir d'anticorps monoclonaux de souris purifiés, d'isotype IgG1, kappa. Le TC689 est fourni sous forme liquide dans un tampon contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN₃) de pH 7,2. Chaque flacon contient suffisamment de conjugué pour 50 tests (20 µL de conjugué pour 10⁶ leucocytes au maximum issu du sang périphérique d'individus sains).

Spécificité

L'anticorps anti-CD19, HD37, a été évoqué lors des Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Deuxième, troisième, quatrième et cinquième conférences et ateliers internationaux sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains [HLDA]). Les études réalisées par plusieurs laboratoires ont confirmé sa réactivité avec le CD19 (7, 8). L'anticorps anti-CD19, HD37, marque les lymphocytes B humains du sang périphérique, de la moelle osseuse et d'autres tissus. Par ailleurs, des réactions positives ont été obtenues avec l'anticorps pour les syndromes lymphoprolifératifs à lymphocytes B, à savoir les leucémies lymphoblastiques aiguës, les leucémies lymphocytaires chroniques, les leucémies à tricholeucocytes, les lymphomes lymphoblastiques (de type Burkitt), les lymphomes centroblastiques/centrocytiques et les lymphomes diffus non hodgkiniens (7, 8).

L'anticorps anti-CD34, BIRMA-K3, a été évoqué lors de la Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Sixième conférence et atelier international sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains [HLDA]). Les études réalisées par plusieurs laboratoires ont confirmé sa réactivité avec le CD34 et avec l'épitope de classe III (9). En cytométrie de flux, l'anticorps marque les cellules KG-1a (lignée cellulaire d'une leucémie myéloïde primitive, connue pour réagir positivement avec le CD34) (10).

L'anticorps anti-CD22, 4KB128, a été inclus lors des Third and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Troisième et Cinquième Conférences et Ateliers Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains [HLDA]) (11, 12). Des études réalisées par plusieurs laboratoires ont confirmé sa réactivité avec l'antigène CD22. L'anticorps anti-CD22, 4KB128, réagit avec les lymphocytes B sains et néoplasiques mais ne réagit pas avec d'autres types cellulaires hématopoïétiques (11).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), 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.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

Conservation

Conservé dans l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée 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'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons du patient. En cas de coloration inattendue, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et de suspicion d'un problème avec le réactif, contacter notre service technique.

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 20 µL de TC689 et mélanger doucement à l'aide d'un agitateur vortex.
3. Incuber le tube dans l'obscurité entre 2 et 8 °C pendant 30 minutes ou à température ambiante (20–25 °C) pendant 15 à 30 minutes.
4. Ajouter 100 µL de réactif Uti-Lyse™ Reagent A (réf. Dako S3325) dans le tube et mélanger doucement à l'aide d'un agitateur vortex. Incuber le tube dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.
5. Ajouter 1 mL de réactif Uti-Lyse™ Reagent B (réf. Dako S3325) dans le tube et mélanger doucement à l'aide d'un agitateur 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. Dako S3024) dans le tube et remettre les cellules en suspension à l'aide d'un agitateur vortex.
8. Répéter l'étape 6.
9. Remettre les cellules en suspension dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de PBS.
10. Analyser l'échantillon sur un cytomètre en flux ou le 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 donc 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 à chaque cycle pour contrôler les réactifs et la 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 au cas par cas par chaque laboratoire.

L'utilisation d'un tube à essai de réactif de contrôle est facultative. Le réactif de contrôle doit correspondre au réactif anticorps conjugué. Le réactif de contrôle tricolore recommandé pour le TC689 est le produit Dako de réf. X0978.

Étapes 4 et 5 : Si un autre réactif de lyse cellulaire est utilisé, suivre les recommandations fournies pour ce réactif. Noter que si le réactif de lyse utilisé ne contient pas de fixateur comme le Dako EasyLyse™, réf. S2364, le PBS de l'étape 9 doit contenir 1% de paraformaldéhyde ou l'échantillon doit être analysé dans les délais recommandés pour le réactif de lyse.

Étape 10 : Pour certaines maladies, on peut s'attendre à obtenir des nombres anormaux 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. La combinaison du FITC, de la RPE et de l'APC est particulièrement facile à utiliser car le chevauchement des spectres d'émission de ces fluorochromes est minime.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

TC689 ist für durchflusszytometrische Testverfahren bestimmt. Das Reagenz dient zur Identifizierung von CD19- und CD22-positiven B-Zellen sowie CD34-positiven Vorläuferzellen.

CD19 ist der umfassendste abstammungsspezifische Oberflächenmarker für B-Zellen, der auf nahezu allen B-Lymphozyten einschließlich früher B-Vorläuferzellen vorkommt (1). In B-Zellen, die eine neoplastische Transformation durchlaufen haben, bleibt die CD19-Expression erhalten (2). Antikörper gegen CD19 gelten als wichtig bei der Erstuntersuchung akuter und chronischer lymphoproliferativer Erkrankungen (3).

Das CD34-Antigen kommt auf humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen in Knochenmark und Blut vor. Auf Leukozyten und Thrombozyten im peripheren Blut dagegen ist CD34 normalerweise nicht nachweisbar (4). CD34 wird in etwa 60% der Fälle akuter B-lymphoider Leukämie, 40% der akuten myeloischen Leukämien (AML) sowie 1% bis 5% der akuten T-lymphoiden Leukämien exprimiert (4). Chronisch lymphoide Leukämien, Lymphome und multiple Myelome waren durchweg CD34-negativ (4, 5).

Das CD22-Antigen wird in Proben humanen peripheren Bluts und Knochenmarks auf normalen und neoplastischen B-Lymphozyten exprimiert. CD22 liegt auch in B-Zell-Neoplasien, darunter undifferenzierten Lymphomen, bei denen das monoklonale Oberflächenimmunglobulin fehlt, sowie bei den meisten Fällen der akuten lymphoblastischen Leukämie vor (6).

Die Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten ausgewertet werden.

Mitgelieferte Reagenzien

TC689 enthält folgende drei aufeinander abgestimmte fluoreszierende Antikörper:

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19, Clone HD37, konjugiert mit Fluoreszein-Isothiozyanat-Isomer 1 (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD34, Clone BIRMA-K3, konjugiert mit R-Phycoerythrin (RPE).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD22, Clone 4KB128, konjugiert mit Allophycocyanin (APC).

Die drei in TC689 enthaltenen Konjugate wurden aus gereinigten monoklonalen Mausantikörpern vom Isotyp IgG1, Kappa hergestellt. TC689 wird in flüssiger Form in einem Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L Na₃, pH 7,2 geliefert. Jedes Fläschchen enthält Konjugat für 50 Tests (20 µL Konjugat für bis zu 10⁶ Leukozyten aus normalem humanem peripherem Blut).

Spezifität

Anti-CD19, HD37 wurde bei den Second, Third, Fourth and Fifth International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2., 3., 4. und 5. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht, und seine Reaktivität mit CD19 wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt (7, 8). Anti-CD19, HD37 markiert humane B-Zellen in peripherem Blut, Knochenmark und anderen Geweben. Außerdem zeigten lymphoproliferative Erkrankungen der B-Zellen mit dem Antikörper positive Reaktionen, z.B. bei akuter lymphoblastischer bzw. chronisch lymphatischer Leukämie, Haarzellenleukämie, beim lymphoblastischen (Typ Burkitt) und Zentroblasten-/Zentrozyten-Lymphom sowie beim diffusen Non-Hodgkin-Lymphom (7, 8).

Anti-CD34, BIRMA-K3 wurde bei dem/der Sixth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (6. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht, und seine Reaktivität mit CD34 und Epitopen der Klasse III wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt (9). In der Durchflusszytometrie markiert der Antikörper KG-1a-Zellen (eine bekanntermaßen CD34-positive primitive myeloische Leukämie-Zelllinie) (10).

Anti-CD22, 4KB128 wurde bei dem/der Third and Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3. und 5. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht (11, 12), und seine Reaktivität mit dem CD22-Antigen wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt. Anti-CD22, 4KB128 reagiert mit normalen und neoplastischen B-Zellen, nicht jedoch mit anderen hämatopoetischen Zelltypen (11).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

Aufbewahrung

Im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Reagenz hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Färbeverfahren

1. 100 µL antikoaguliertes (EDTA) Blut in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.

2. 20 µL TC689 zugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen.

3. Das Teströhrchen 30 Minuten im Dunkeln bei 2–8 °C oder 15–30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.

4. 100 µL Uti-Lyse™ Reagent A (Dako Code-Nr. S3325) dazugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen. Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.

5. Dem Teströhrchen 1 µL Uti-Lyse™ Reagent B (Dako Code-Nr. S3325) zusetzen und mit einem Vortexer vorsichtig mischen. Teströhrchen 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.

6. 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 µL Flüssigkeit übriglassen.

7. 2 mL PBS (Dako Code-Nr. S3024) dazugeben und Zellen mit einem Vortexer resuspendieren.

8. Schritt 6 wiederholen.

9. Zellen in einer geeigneten Flüssigkeit, z.B. 0,3 mL PBS, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.

10. Probe auf einem Durchflusszytometer analysieren oder bis zur Analyse bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Die Proben innerhalb von 24 Stunden nach dem Färben analysieren.

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: Die empfohlene Konjugatmenge gilt nur als Richtlinie. Optimale Färbungsbedingungen können je nach Probe und Vorbereitungsverfahren 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 TC689 wird Dako Code-Nr. X0978 als dreifarbiges Kontrollreagenz empfohlen.

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










Schritt 10: Bei einigen Krankheitsbildern sind bei den das Zielantigen exprimierenden Zellen anomale Mengen 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 sind mehrfarbige Reagenzien einfarbigen vorzuziehen. Die korrekte Durchführung des Farbausgleichs ist bei der Mehrfarben-Analyse von besonderer Bedeutung. Die Kombination aus FITC, RPE und APC ist besonders einfach in der Anwendung, da es bei den Emissionsspektren dieser Fluorochrome nur zu minimalen Überschneidungen kommt.

References/ Références/ Literatur

1. 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.
2. 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.
3. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001;46:23-7.
4. Civin CI, Trischmann TM, Fackler MJ, Bernstein ID, Bühring HJ, Campos L, et al. M7.1. Report on the CD34 cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. *Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference*; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 818-25.
5. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Devaux Y, Treille D, Larese A, et al. Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol* 1989;72:161-6.
6. Mason DY, Stein H, Gerdes J, Pulford KAF, Ralfkiaer E, Falini B, et al. Value of monoclonal anti-CD22 (p135) antibodies for the detection of normal and neoplastic B lymphoid cells. *Blood* 1987;69:836-40.
7. Nadler LM. B cell/leukemia panel workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. *Leucocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens*; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume 2. p. 3-43.
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. *Leucocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens*; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume 2. p. 245-55.
9. Nishio H, Tada J, Hashiyama M, Hirn J, Ingles-Esteve J, Suda T. MC7. CD34 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. 974-84.
10. Höffkes H-G, Lowe JA, Pedersen RO, Schmidtko G, McDonald DF. BIRMA-K3, a new monoclonal antibody for CD34 immunophenotyping and stem and progenitor cell assay. *J Hematother* 1996;5:261-70.
11. Kehl JH. B6 CD22 Workshop Panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. *Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference*; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press. Volume 1. 1995. p. 523-5.
12. Moldenhauer G, Schwartz R, Dörken B, Hämmerling GJ. B2.2 Biochemical characterization and epitope analysis of B-lymphocyte specific surface antigens defined by clustering Workshop monoclonal antibodies. In: McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, Crumpton MJ, Gilks W, Gotch FM, et al., editors. *Leucocyte typing III. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 3rd International Workshop and Conference*; 1986 Sep 21-26; Oxford, England. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1987. p. 378-82.

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) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)	 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