

MultiMix™
Triple-Colour Reagent
Anti-Human MPO/FITC
Anti-Human CD79 α cy/RPE
Anti-Human CD3/APC
Code No./ Code/ Code-Nr. TC667
ENGLISH

Intended use	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>TC667 is intended for use in flow cytometry. The reagent is intended for use in identification of myeloperoxidase (MPO) in granulocytes and in monocytes, CD79αcy-positive B cells and, CD3-positive T cells. MPO is a lysosomal enzyme present in neutrophil granulocytes and at low levels in monocytes. Expression of CD79 is largely restricted to B-lineage cells. CD3 is a pan-T-cell antigen and a marker for normal and neoplastic T cells. TC667 is useful for the identification of intracellular MPO, CD79α and CD3. Investigation of surface expression of CD79α and CD3 should be performed separately. Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.</p>
Reagent provided	<p>TC667 comprises the following three matched fluorescent antibodies:</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloperoxidase, Clone MPO-7, conjugated with fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC).</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human CD79αcy, Clone HM57, conjugated with R-phycoerythrin (RPE).</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, Clone UCHT1, conjugated with allophycocyanin (APC).</p> <p>The three conjugates in TC667 have been produced from purified monoclonal mouse antibodies of isotype IgG1, kappa. TC667 is provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Each vial contains 50 tests (20 μL of conjugate for up to 10⁶ leucocytes from normal human peripheral blood).</p>
Specificity	<p>In flow cytometry Anti-Myeloperoxidase, 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 lineage are labelled. Anti- Myeloperoxidase, MPO-7, also labels the human promyelocyte cell line HL-60, while other myeloid and lymphoid cell lines are consistently unreactive (1).</p> <p>Anti-CD79αcy, HM57, was clustered as anti-CD79α at the Fifth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (2).</p> <p>Anti-CD3, UCHT1, was included in the First and Third International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens, and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with CD3 (3). Anti-CD3, UCHT1, reacts with the ϵ-chain of CD3 (4).</p>
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> 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.
Storage	<p>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.</p>
Staining procedure	<ol style="list-style-type: none"> Transfer 50 μL (up to 10⁶ cells) of anticoagulated (EDTA) whole blood, bone marrow or mononuclear cells to a 12 mm x 75 mm polystyrene test tube. Add 100 μL Dako IntraStain, Reagent A (Fixation), code No. K2311. Mix gently with a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension. Incubate at room temperature for 15 minutes. Add 2 mL PBS (code No. S3024) and mix gently with a vortex mixer. Centrifuge at 300 x g for 5 minutes, then aspirate the supernatant, leaving approximately 50 μL of fluid. Mix thoroughly with a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension and add 100 μL Dako IntraStain, Reagent B (Permeabilization), code No. K2311. Add 20 μL TC667 and mix gently with a vortex mixer to ensure that the cells are in suspension. The 20 μL is a guideline only; the optimal volume should be determined by the individual laboratory. The recommended negative control for TC667 is Dako code No. X0978, a FITC, RPE and APC-conjugated reagent of the same isotype as TC667. Add 20 μL of X0978 to the sample and mix gently with a vortex mixer. The 20 μL is a guideline only; the optimal volume should be determined by the individual laboratory. Incubate in the dark at room temperature for 15 minutes. Repeat steps 4 and 5. Resuspend pellet in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL PBS (code No. S3024). Analyse on a flow cytometer. If the samples are not analysed immediately, they may be stored in the dark at 2-8 °C for up to 8 hours. <p>Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. 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.</p>

Abnormal numbers of cells expressing the target antigens or aberrant expression levels of the antigens 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 for the antigens and their relationship to expression of other relevant antigens in order to perform appropriate analysis.

Multicolour reagents are preferable to single-colour analysis for the comprehensive analysis of neoplastic cells of leukaemia and lymphoma. 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 there is minimal spectral overlap in the emission spectra of these fluorochromes.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Réservé au diagnostic *in vitro*.

TC667 est destiné à être utilisé en cytométrie en flux. Le réactif est destiné à être utilisé pour l'identification de la myéloperoxydase (MPO) dans les granulocytes et les monocytes, dans les lymphocytes B CD79 α cy+ et les lymphocytes T CD3+. La MPO est une enzyme lysosomale présente dans les granulocytes neutrophiles et à faible concentration dans les monocytes. L'expression du CD79 est largement limitée aux cellules de la lignée B. Le CD3 est un antigène « pan-T ». C'est un marqueur des lymphocytes T sains et néoplasiques. TC667 est utile pour l'identification de la MPO, du CD79 α et du CD3 intracellulaires. La recherche de l'expression du CD79 α et du CD3 sur la surface cellulaire doit être effectuée séparément. Les résultats doivent être interprétés par un professionnel agréé et tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques.

Réactifs fournis

TC667 comprend les trois anticorps fluorescents suivants:

Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloperoxidase, Clone MPO-7, conjugué à l'isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD79 α cy, Clone HM57, conjugué à la R-phycoérythrine (RPE).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, Clone UCHT1, conjugué à l'allophycocyanine (APC).

Les trois conjugués du TC667 ont été préparés à partir d'anticorps monoclonaux purifiés de souris d'isotype IgG1, kappa. TC667 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) à pH 7,2. Chaque flacon contient 50 tests (20 μ L de conjugué pour 10⁶ leucocytes au maximum à partir de sang périphérique humain d'un individu sain).

Spécificité

En cytométrie en flux, l'anticorps anti-myéloperoxydase, 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'anticorps anti-myéloperoxydase, MPO-7, marque également la lignée cellulaire promyélocytaire humaine HL-60, alors que d'autres lignées cellulaires myéloïdes et lymphoïdes ne présentent invariablement aucune réactivité (1).

L'anticorps anti-CD79 α cy, HM57 a été classifié comme un anti-CD79 α au Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Cinquième Conférence et Atelier Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)) (2).

L'anticorps anti-CD3, UCHT1, a été inclus lors des First and Third International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Première et Troisième Conférences et Ateliers Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)). Des études réalisées par plusieurs laboratoires ont confirmé sa réactivité avec le CD3 (3). L'anticorps anti-CD3, UCHT1, réagit avec la chaîne ϵ du CD3 (4).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique très 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 pour former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. 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.

Conservation

Conserver à l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date limite 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, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire et en cas de suspicion d'un problème avec l'anticorps, contacter notre service technique.

Procédure de coloration

1. Transférer 50 μ L (jusqu'à 10⁶ cellules) de sang total non coagulé (EDTA), de moelle osseuse ou de cellules mononucléées dans un tube à essai en polystyrène de 12 mm x 75 mm.
2. Ajouter 100 μ L d'IntraStain, Reagent A (Fixation) de Dako, n° de catalogue K2311. Mélanger doucement à l'aide d'un vortex pour s'assurer que les cellules sont bien en suspension.
3. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
4. Ajouter 2 mL de PBS (n° de catalogue S3024) et mélanger doucement à l'aide d'un vortex.
5. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes, puis aspirer le surnageant. Laisser environ 50 μ L de liquide.
6. Bien mélanger à l'aide d'un vortex pour s'assurer que les cellules sont bien en suspension et ajouter 100 μ L d'IntraStain, Reagent B (Permeabilisation) de Dako, n° de catalogue K2311.
7. Ajouter 20 μ L de TC667 et mélanger doucement à l'aide d'un vortex pour s'assurer que les cellules sont bien en suspension. Le volume de 20 μ L n'est donné qu'à titre indicatif ; le volume optimal doit être déterminé par chaque laboratoire.
8. Le contrôle négatif recommandé pour TC667 est un réactif de Dako, n° de catalogue X0978, conjugué au FITC, RPE et APC, de même isotype que TC667. Ajouter 20 μ L de X0978 dans l'échantillon et mélanger doucement à l'aide d'un vortex. Le volume de 20 μ L n'est donné qu'à titre indicatif ; le volume optimal doit être déterminé par chaque laboratoire.
9. Incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant 15 minutes.
10. Répéter les étapes 4 et 5.
11. Remettre le culot en suspension dans un liquide approprié pour la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de PBS (n° de catalogue S3024).

12. Analysieren Sie mit einem Durchflusszytometer. Wenn die Proben nicht sofort analysiert werden können, können sie bei 2 bis 8 °C für 8 Stunden im Dunkeln gelagert werden.

Die optimalen Bedingungen können je nach Probenahme- und Präparationsmethode variieren und müssen für jedes Labor individuell bestimmt werden. Es wird empfohlen, ein Positiv- und ein Negativkontrollenzyklus für jeden Zyklus der Analyse zu verwenden. Beachten Sie, dass die Konjugate für Durchflusszytometrie lichtempfindlich sind. Die Proben müssen vor der Färbung vor Licht geschützt werden.

Für bestimmte Krankheiten kann es zu Abweichungen der Zellzahlen kommen, die die Färbung beeinflussen. Um genaue Analysen durchführen zu können, ist es wichtig, das normale Expressionsprofil der Antigene und die Beziehungen zu anderen relevanten Antigenen zu kennen.

Multifarbige Reagenzien sind gegenüber Analysen mit nur einer Farbe für eine detaillierte Analyse von Leukämie und Lymphom vorzuziehen. Die richtige Kompensation der Farbe ist besonders wichtig bei multifarbigem Durchflusszytometer. Die Kombination von FITC, RPE und APC ist besonders einfach zu verwenden, da die Überlappung der Emissionsspektren dieser Fluorochrome minimal ist.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

TC667 ist für die Verwendung bei der Durchflusszytometrie vorgesehen. Das Reagenz ist für die Identifizierung von Myeloperoxidase (MPO) in Granulozyten und Monozyten, CD79 α -positiven B-Zellen und CD3-positiven T-Zellen vorgesehen. MPO ist ein lysosomales Enzym, das in neutrophilen Granulozyten und in geringen Mengen auch in Monozyten vorkommt. Die Expression von CD79 ist überwiegend auf von B-Zellen abstammende Zellen begrenzt. CD3 ist ein Pan-T-Zell-Antigen und ein Marker für normale und neoplastische T-Zellen. TC667 ist bei der Identifizierung von intrazellulärem MPO, CD79 α und CD3 nützlich. Eine Untersuchung der Oberflächenexpression von CD79 α und CD3 sollte separat durchgeführt werden. Auswertungen müssen von einer qualifizierten Person unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Mitgeliefertes Reagenz

TC667 enthält die folgenden drei aufeinander abgestimmten Antikörper:

Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloperoxidase, Clone MPO-7, konjugiert mit Fluoreszein-Isotiozyanat-Isomer 1 (FITC).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD79 α , Clone HM57, konjugiert mit R-Phycoerythrin (RPE).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, Clone UCHT1, konjugiert mit Allophycocyanin (APC).

Die drei in TC667 enthaltenen Konjugate wurden aus gereinigten monoklonalen Mausantikörpern vom Isotyp IgG1, Kappa hergestellt. TC667 wird in flüssiger Form in einem Puffer mit 1 % Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L Na₂CO₃, pH 7,2 geliefert. Jedes Fläschchen enthält 50 Tests (20 μ L Konjugat für bis zu 10⁶ Leukozyten aus normalem menschlichen peripheren Blut).

Spezifität

Bei der Durchflusszytometrie markiert Anti-Myeloperoxidase, MPO-7 das Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten in peripherem Blut stark. Monozyten sind schwach positiv, während Lymphozyten keine Reaktion aufweisen. Im Knochenmark werden von Granulozyten abstammende Zellen markiert. Anti-Myeloperoxidase, MPO-7 markiert auch die menschliche Promyelozyten-Zelllinie HL-60, während andere myeloische und lymphoide Zelllinien durchwegs nicht reaktiv sind (1).

Anti-CD79 α , HM57 wurde beim Fifth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5. Internationale(r) Workshop über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) als Anti-CD79 α geclustert (2).

Anti-CD3, UCHT1, wurde bei dem/der First and Third International Workshops and Conferences on Human Leucocyte Differentiation Antigens (1. und 3. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht und seine Reaktivität mit CD3 wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt (3). Anti-CD3, UCHT1 reagiert mit der ϵ -Kette von CD3 (4).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach deren Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs muss auch dieses entsprechend gehandhabt werden.

Aufbewahrung

Bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatums 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 zum gleichen Zeitpunkt 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 Antikörper hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Färbeverfahren

- 50 μ L (bis zu 10⁶ Zellen) antikoaguliertes (EDTA) Vollblut, Knochenmark oder mononukleäre Zellen in ein 12 mm x 75 mm Polystyrol-Teströhrchen geben.
- 100 μ L Dako IntraStain, Reagent A (Fixation), Code-Nr. K2311 dazugeben. Mit einem Vortexer vorsichtig mischen, um zu gewährleisten, dass die Zellen suspendiert sind.
- Bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren.
- 2 mL PBS (Code-Nr. S3024) dazugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen.
- 5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren und anschließend den Überstand absaugen. Dabei etwa 50 μ L Flüssigkeit übriglassen.
- Vorsichtig mit einem Vortexer mischen, um zu gewährleisten, dass die Zellen suspendiert sind, und 100 μ L Dako IntraStain, Reagent B (Permeabilisation), Code-Nr. K2311 dazugeben.
- 20 μ L TC667 dazugeben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen, um zu gewährleisten, dass die Zellen suspendiert sind. 20 μ L sind nur ein Richtwert; die optimale Menge sollte von jedem Labor selbst bestimmt werden.
- Die empfohlene Negativkontrolle für TC667 ist Dako Code-Nr. X0978, ein FITC-, RPE- und APC-konjugiertes Reagenz vom selben Isotyp wie TC667. 20 μ L X0978 in die Probe geben und mit einem Vortexer vorsichtig mischen. 20 μ L sind nur ein Richtwert; die optimale Menge sollte von jedem Labor selbst bestimmt werden.

9. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren.
10. Schritt 4 und 5 wiederholen.
11. Pellet in einer geeigneten Flüssigkeit für die Durchflusszytometrie resuspendieren, wie z.B. 0,3 mL PBS (Code-Nr. S3024).
12. Auf einem Durchflusszytometer analysieren. Wenn die Proben nicht sofort analysiert werden, können sie im Dunkeln bei 2–8 °C bis zu 8 Stunden aufbewahrt werden.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Vorbereitungsmethode unterschiedlich sein und sollten von jedem Labor selbst bestimmt werden. Es wird empfohlen, als Kontrolle für das Reagenz und das Präparat bei jedem Testdurchlauf eine geeignete positive und negative Kontrollprobe mitlaufen zu lassen. Bitte beachten, dass Fluorochrom-Konjugate lichtempfindlich sind und die Proben während des Färbeverfahrens und bis zur Analyse vor Licht geschützt werden sollten.










In einigen Krankheitsstadien sind anomale Mengen von Zellen, die die Zielantigene exprimieren, oder abweichende Expressionslevel der Antigene zu erwarten. Dies kann zu einem veränderten Färbemuster führen. Um entsprechende Analysen durchführen zu können, ist es wichtig, das normale Expressionsmuster für die Antigene und deren Verhältnis zur Expression von anderen relevanten Antigenen zu kennen.

Mehrfarbige Reagenzien sind einfarbigen Reagenzien bei der umfassenden Analyse von neoplastischen Leukämie- und Lymphomzellen vorzuziehen. Bei der Mehrfarben-Analyse ist die korrekte Durchführung des Farbausgleichs von besonders hoher Bedeutung. Die Kombination von FITC, RPE und APC ist besonders einfach in der Anwendung, da es bei den Emissionsspektren dieser Fluorochrome nur zu einer minimalen Überschneidung kommt.

References/ Références/ Literatur

1. Nakase K, Sartor M, Bradstock K. Detection of myeloperoxidase by flow cytometry in acute leukemia. *Cytometry* 1998;34:198-202.
2. Engel P, Wagner N, Tedder TF. B23. CD79 workshop report. In: Schlossman SF, Bousmell 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; 1995. Volume 1. p. 667-70.
3. McMichael AJ, Gotch FM. T-cell antigens: new and previously defined clusters. 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 Sept 21-26; Oxford, England.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1987. p. 31-62.
4. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, de la Hera A. T3.2. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. 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. 295-6.

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

Revision / Révision / Revision 2020.11