

Návod k použití FIX&PERM®

Pro barvení suspenze a průtokové cytometrické analýzy povrchových membránových a intracelulárních antigenů.

REF **GAS-002-1-CE/IVD** FIX&PERM® Kit 1000 Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A (fixační médium)	1 x 100 ml	1 000 testů
Roztok B (permeabilizační médium)	1 x 100 ml	1 000 testů



REF **GAS-002-CE/IVD** FIX&PERM® Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A (fixační médium)	4 x 5 ml	200 testů
Roztok B (permeabilizační médium)	4 x 5 ml	200 testů

REF **GAS-002M-CE/IVD** FIX&PERM® Sada vzorků Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A (fixační médium)	1 x 5 ml	50 testů
Roztok B (permeabilizační médium)	1 x 5 ml	50 testů

REF **GAS-002A-1-CE/IVD** FIX&PERM® Roztok A (Fix) Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A (fixační médium)	1 x 100 ml	1 000 testů
---------------------------	------------	-------------

REF **GAS-002B-1-CE/IVD** FIX&PERM® Roztok B (Perm) Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok B (permeabilizační médium)	1 x 100 ml	1 000 testů
-----------------------------------	------------	-------------

IVD Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*

 Nordic Immunological Laboratories BV, Nordic-MUBio, Rangeerweg 5A, 6114 BC Susteren, Nizozemsko

Zamýšlený účel

Zařízení je určeno k přípravě vzorků buněčné suspenze pro průtokovou cytometrickou analýzu. Takové analýzy v kombinaci s (monoklonálními) protilátkami byly dříve omezeny na povrchové molekuly buněk. Intracelulární struktury, jako jsou cytoplazmatické nebo jaderné enzymy, onkoproteiny, cytokiny, imunoglobuliny atd., byly z těchto studií většinou vyloučeny. Z průtokových cytometrických studií byly rovněž vyloučeny cytoplazmatické lokalizace dobře zavedených membránových molekul. Pomocí FIX&PERM® se stala průtoková cytometrická analýza intracelulárních (cytoplazmatických a jaderných) antigenů stejně snadnou jako studie povrchových antigenů. Roztoky FIX&PERM® lze použít v automatizovaném i neautomatizovaném prostředí ke studiu vzorků periferních krvinek, aspirátů kostní dřeně, suspenzí mononukleárních buněk nebo buněčných suspenzí připravených z pevných tkání a buněk kultivovaných *in vitro*.

Tento produkt je určen pouze pro profesionální *in vitro* diagnostické použití.

Obecné informace

FIX&PERM® obsahuje 1 nebo 2 roztoky: Fixační médium (roztok A) a/nebo permeabilizační médium (roztok B). Je určen (neprve) k fixaci buněk v suspenzi roztokem A a (následně) permeabilizaci buněčných membrán roztokem B. Tento postup umožňuje nejen imunobarvení povrchových antigenů buněk, ale také umožňuje protilátkám přístup k intracelulárním strukturám a ponechává neporušené morfologické charakteristiky rozptylu buněk. Specifické složení snižuje barvení na pozadí a umožňuje současně přidání permeabilizačního média a fluorochromem značených protilátek. FIX&PERM® je vhodný pro analýzu normálních a maligních populací leukocytů získaných z různých lidských biologických vzorků (vzorky periferních krvinek, aspiráty kostní dřeně, suspenze mononukleárních buněk nebo buněčné suspenze připravené z pevné tkáně a buněk kultivovaných *in vitro*) pomocí průtokové cytometrie. Roztoky FIX&PERM® jsou určeny pro použití se všemi komerčně dostupnými průtokovými cytometry.

OBSAH

Dodávané materiály

REF **GAS-002-1-CE/IVD** FIX&PERM® Kit 1000 Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A Složení roztoku A (fixační médium) je patentované, obsahuje 4-10 % formaldehydu ve fosfátovém pufru.
1 x 100 ml 1 000 testů

Roztok B Složení roztoku B (permeabilizační médium) je patentované, obsahuje 0,05 % azidu sodného.

1 x 100 ml

1 000 testů

REF **GAS-002-CE/IVD** FIX&PERM® Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A

Složení roztoku A (fixační médium) je patentované, obsahuje 4-10 % formaldehydu ve fosfátovém pufru..
4 x 5 ml 200 testů

Roztok B

Složení roztoku B (permeabilizační médium) je patentované, obsahuje 0,05 % azidu sodného.
4 x 5 ml 200 testů

REF **GAS-002M-CE/IVD** FIX&PERM® Sample Kit Sada vzorků Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A

Složení roztoku A (fixační médium) je patentované, obsahuje 4-10 % formaldehydu ve fosfátovém pufru..
1 x 5 ml 50 testů

Roztok B

Složení roztoku B (permeabilizační médium) je patentované, obsahuje 0,05 % azidu sodného.
1 x 5 ml 50 testů

REF **GAS-002A-1-CE/IVD** FIX&PERM® Roztok A (Fix) Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok A

Složení roztoku A (fixační médium) je patentované, obsahuje 4-10 % formaldehydu ve fosfátovém pufru..
1 x 100 ml 1 000 testů

REF **GAS-002B-1-CE/IVD** FIX&PERM® Roztok B (Perm) Souprava pro fixaci a permeabilizaci buněk

Roztok B

Složení roztoku B (permeabilizační médium) je patentované, obsahuje 0,05 % azidu sodného.
1 x 100 ml 1 000 testů

Požadované, ale nedodávané materiály

Používejte vhodná bezpečnostní opatření, jako je nošení laboratorního pláště, rukavic, ochranných brýlí atd.

Skleněné nebo plastové zkumavky o objemu 5 ml

Pipety, vortex a odstředivka

Průtokový cytometr a plášťová tekutina

Vhodně (fluorochromem) konjugované protilátky

Fosfátový pufrovaný roztok (PBS)

1% roztok formaldehydu (volitelně)

Odběr, skladování a manipulace se vzorky

Vzorky biologických buněk (vzorky periferních krvinek, aspiráty kostní dřeně, suspenze mononukleárních buněk nebo buněčné suspenze připravené z pevné tkáně a buněk kultivovaných *in vitro*) musí být odebrány za sterilních podmínek. Doporučuje se antikoagulační pomoci EDTA nebo heparinu. Vzorky by měly být až do použití uchovávány při pokojové teplotě. Pro dosažení optimálních výsledků by měly být vzorky zpracovány a analyzovány do 24 hodin. Vzorky s vysokým počtem neživých buněk mohou způsobit falešné výsledky, takové případy vyžadují stanovení životaschopnosti buněk v samostatném vzorku např.

propidium jodidem bez fixace a permeabilizace pomocí FIX&PERM®. Se všemi biologickými vzorky je třeba zacházet opatrně.

Vždy je považujte za potenciálně infekční. Používejte vhodná bezpečnostní opatření, jako jsou rukavice, laboratorní plášť atd.

Postup fixace, permeabilizace a barvení

Roztoky FIX&PERM® jsou připraveny k použití.

- Pro každý analyzovaný vzorek přidejte 50 µl plné krve, aspirátu kostní dřeně, suspenze mononukleárních buněk nebo buněčných suspenzí připravených z pevné tkáně a buněk kultivovaných *in vitro* do 5ml zkumavky
- Přidejte 100 µl roztoku A (fixační médium, uchovávané a používané při pokojové teplotě).
- Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě
- Přidejte 5 ml fosfátového pufru a odstředíte buňky 5 minut při 300xg.
- Odstraňte supernatant a přidejte k buněčné peletě 100 µl roztoku B (permeabilizační médium) a 20 µl příslušného konjugátu protilátek.
- Protřepejte při nízkých otáčkách po dobu 1-2 sekund
- Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě
- Promyjte bunky fyziologickým roztokem s fosfátovým pufrům, jak je popsáno výše.
- Odstraňte supernatant a resuspendujte buňky v plášťové tekutině pro okamžitou analýzu nebo resuspendujte buňky v 0,5 ml 1,0 % formaldehydu a uchovávejte je při 2-8 °C ve tmě. Fixované buňky analyzujte do 24 hodin.

Poznámky: Ve zvláštních případech (zředěné vzorky kostní dřeně, jiné vzorky obsahující málo rozpustných bílkovin) může být prospěšné doplnit před ošetřením FIX&PERM® složky plazmy, aby se vytvořilo prostředí, které se více podobá situaci v protisrážlivé krvi. Za tímto účelem se doporučuje přidání IgG preparátů (např. beriglobulin P, ZLB Behring, konečná koncentrace 10 mg/ml) a lidského sérového albuminu (např. lidský albumin "Behring" 20% - infuzní roztok, konečná koncentrace 40 mg/ml).

Charakteristiky účinnosti

Ve velkém množství publikací (viz vybrané odkazy níže) bylo prokázáno, že FIX&PERM® umožňuje úspěšné imunobarvení povrchových buněčných markerů a intracelulárních antigenů v různých typech buněk získaných z periferní krve nebo kostní dřeně a zároveň ponechává rozptylové charakteristiky těchto typů buněk nedotčené. Výsledkem je že různé typy buněk a jejich stádia zrání lze kvantifikovat průtokovými cytometrickými technikami v normálních a (pre)maligních krevních aspirátech a aspirátech kostní dřeně. Ilustrace reprezentativních výkonnostních charakteristik viz příklady níže. Výkonnost každé šarže FIX&PERM® se

určuje fixací a permeabilizací dobře definovaných vzorků krve od reprezentativních dárců a následným porovnáním charakteristik přímého a bočního rozptylu získaných leukocytů a také účinnosti imunobarvení pro několik membránových a cytoplazmatických antigenů. Odchytky pro 7 parametrů stanovených mezi následnými šaržemi jsou všechny menší než 10 %.

Omezení techniky

Při použití FIX&PERM[®] se stala průtoková cytometrická analýza intracelulárních antigenů stejně snadnou jako studie povrchových antigenů. Jedinou podmínkou je dostupnost vhodných konjugovaných protilátek. Většinu dostupných (monoklonálních) protilátkových konjugátů lze použít s FIX&PERM[®], některé determinanty jsou však citlivé na příslušný fixační krok. To a optimální dobu fixace je třeba pro každý roztok otestovat. Některé příklady barvení s konjugáty protilátek jsou uvedeny níže.

Roztoky FIX&PERM[®] jsou určeny pro použití se všemi komerčně dostupnými průtokovými cytometry. Vyrovnání a kompenzace by měly být provedeny podle pokynů výrobce. Průtokovou cytometrii by měli provádět pouze profesionální uživatelé. Nesprávné zarovnání průtokového cytometru, nepřesná kompenzace fluorescence unikající do jiných kanálů i nesprávné umístění oblastí mohou vést k falešným výsledkům. Lýza červených krvinek může být z různých důvodů nemožná. V takových případech se doporučuje před barvením izolovat mononukleární buňky (MNC) centrifugací s gradientem hustoty. Výsledky budou správné a reprodukovatelné, pokud použité postupy respektují technická doporučení a dodržují správnou laboratorní praxi. Roztoky FIX&PERM[®] jsou dodávány v koncentraci, která umožní fixovat a permeabilizovat lidské hematopoetické buňky. Proto se důrazně doporučuje dodržovat pracovní protokol, pokud jde o koncentraci a objem buněk a protilátky. Vlastnosti FIX&PERM[®] byly stanoveny s použitím EDTA antikoagulované periferní krve a aspirátů kostní dřeně.

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pouze pro profesionální uživatele.

Roztok A přípravku FIX&PERM[®] obsahuje formaldehyd a je označen: Škodlivý. Formaldehyd je toxický, alergenní a podezřelý karcinogen. Nikdy nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu s očima, kůží a oděvem. Doporučuje se správný postup při manipulaci. S tímto výrobkem zásadně nesmí pracovat osoby mladší 18 let. Uživatelé musí být pečlivě poučeni o správném pracovním postupu, nebezpečných vlastnostech výrobku a nezbytných bezpečnostních pokynech. Další informace naleznete v bezpečnostním listu (SDS). Zbytky výrobku likvidujte v souladu s místními předpisy.

Jakákoli závažná událost, ke které došlo v souvislosti s tímto prostředkem, musí být nahlášena výrobci a příslušnému orgánu členského státu EU, ve kterém je uživatel a/nebo pacient má své sídlo.

Pouze pro roztok A: obsah nebezpečné látky 4-10% formaldehyd



Nebezpečí

H341: Podezření na způsobení genetických vad (uvedte způsob expozice, pokud je jednoznačně prokázáno, že žádné jiné způsoby expozice nezpůsobují nebezpečí)

H350: Může způsobit rakovinu (uvedte způsob expozice, pokud je jednoznačně prokázáno, že žádné jiné způsoby expozice nezpůsobují nebezpečí)

H317: Může způsobit alergickou kožní reakci

P201: Před použitím si vyžádejte zvláštní pokyny.

P280: Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje.

P308+P313: Pokud je vystaven působení nebo má obavy: Vyhledejte lékařskou pomoc / zásah.

P333+P313: Pokud dojde k podráždění kůže nebo se objeví vyrážka: Vyhledejte lékařskou pomoc / zásah.

P362+P364: Kontaminovaný oděv před dalším použitím svlékněte a vyperte.

Skladování

Roztoky FIX&PERM[®] by se měly uchovávat a používat při pokojové teplotě (18-24°C). Nezamrazujte. Stabilita roztoku: Sledujte prosím datum použitelnosti vytištěné na lahvičce. Použití roztoku po uplynutí doby použitelnosti se nedoporučuje. Pokud jsou roztoky skladovány za jiných než uvedených podmínek, musí si uživatel tyto podmínky prověřit. Nepoužívejte roztoky, pokud se vytvořila sraženina nebo došlo ke změně barvy.

Podmínky skladování po otevření lahviček jsou stejné jako u lahviček neotevřených.

Pokud se objeví neočekávané výsledky, které nelze přičíst rozdílu v laboratorních postupech, kontaktujte nás.

Záruka

Na níže prodávané výrobky se vztahuje záruka pouze na množství a obsah uvedený na etiketě v době dodání zákazníkovi. Neexistují žádné záruky, výslovné ani předpokládané, které by přesahovaly rámec popisu na štítku výrobku. Jediná odpovědnost společnosti Nordic-MUBio je omezena na výměnu výrobků nebo vrácení kupní ceny. Společnost Nordic-MUBio neodpovídá za škody na majetku, zranění osob nebo ekonomické ztráty způsobené výrobkem.

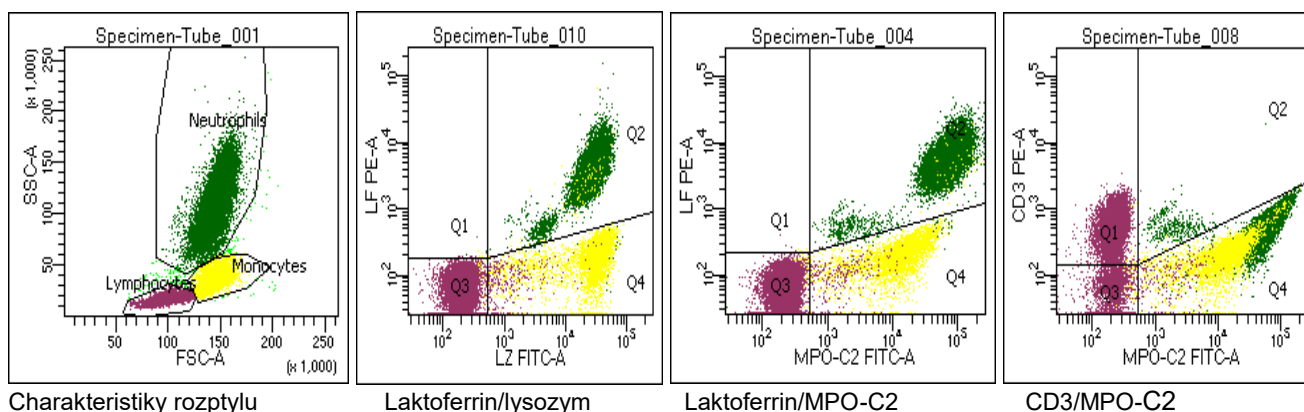
Vybrané odkazy

- Groeneveld, K, te Marvelde, JG, van den Beemd, MW, Hooijkaas, H, van Dongen, JJ (1996) *Leukemia* **10**, 1383-9.
- Haranaga, S., Yamaguchi, H., Friedman, H., Izumi, S., & Yamamoto, Y. (2001) *Infect Immun* **69**, 7753-9.
- Hegazy, A. N. & Klein, C. (2008) *Leukemia* **22**, 2070-9.
- Kappelmayer, J., Gratama, J. W., Karaszí, E., Menendez, P., Ciudad, J., Rivas, R. & Orfao, A. (2000) *J Immunol Methods* **242**, 53-65.
- Kline, MP, Rajkumar, SV, Timm, MM, Kimlinger, TK, Haug, JL, Lust, JA, Greipp, PR, Kumar, S (2007) *Leukemia* **21**, 1549-60

- Knapp, W., Majdic, O. & Strobl, H. (1993) *Recent Results Cancer Res* **131**, 31-40.
- Knapp, W., Strobl, H. & Majdic, O. (1994) *Cytometry* **18**, 187-98.
- Knapp, W., Strobl, H., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C. & Majdic, O. (1995) *Ann Hematol* **70**, 281-96.
- Koníková, E., Glasová, M., Kusenda, J. & Babušíková, O. (1998) *Neoplasma* **45**, 282-91.
- Lanza, F., Latorraca, A., Moretti, S., Castagnari, B., Ferrari, L. & Castoldi, G. (1997) *Cytometry* **30**, 134-44.
- Millard, I., Degrave, E., Philippe, M. & Gala, J. L. (1998) *Clin Chem* **44**, 2320-30.
- Mestrum S.G.C., R.B.Y. Vanblarcum, R.J.M. Drent, B.T. Boonen, W.L.W. van Hemert, F.C.S. Ramaekers, A.H.N. Hopman, M.P.G. Leers. *Cytometry A* (2022) v tisku.
- Mestrum SGC, de Wit NCJ, Drent RJM, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Leers MPG. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(3):322-330.
- Mestrum SGC, Cremers EMP, de Wit NCJ, Drent RJM, Ramaekers FCS, Hopman AHN, Leers MPG. *Leuk Res.* 2022;113:106789.
- Mestrum SGC, Cremers EMP, de Wit NCJ, Drent RJM, Ramaekers FCS, Hopman AHN, Leers MPG. *Data Brief.* 22. února 2022;41:107976
- Nakase, K., Sartor, M. & Bradstock (1998) *Cytometry* **34**, 198-202.
- Nies KPH, Kraaijvanger R, Lindelauf KHK, Drent RJMR, Rutten RMJ, Ramaekers FCS, Leers MPG. *Cytometry A.* (2018) 93, 1097-1105.
- Pascale, F., Contreras, V., Bonneau, M., Courbet, A., Chilmonczyk, S., Bevilacqua, C., Epardaud, M., Niborski, V., Riffault, S., Balazuc, A. M., Foulon, E., Guzylack-Piriou, L., Riteau, B., Hope, J., Bertho, N., Charley, B. & Schwartz-Cornil, I. (2008) *J Immunol* **180**, 5963-72
- Pickl, W. F., Majdic, O., Kohl, P., Stockl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C. & Knapp, W. (1996) *J Immunol* **157**, 3850-9.
- Riera-Sans, L., & Behrens, A. (2007) *J Immunol* **178**, 5690-700
- Roberts, J. L., Lengi, A., Brown, S. M., Chen, M., Zhou, Y. J., O'Shea, J. J. & Buckley, R. H. (2004) *Blood* **103**, 2009-18
- Sargent, R. L., Craig, F. E. & Swerdlow, S. H. (2009) *Int J Clin Exp Pathol* **2**, 574-82
- Scheinecker, C., Strobl, H., Fritsch, G., Csmarits, B., Krieger, O., Majdic, O. & Knapp, W. (1995) *Blood* **86**, 4115-23.
- Sedlmayr, P., Grosshaupt, B. & Muntean, W. (1996) *Cytometry* **23**, 284-9.
- Strobl, H. & Knapp, W. (2004) *J Biol Regul Homeost Agents* **18**, 335-9.
- Strobl, H., Scheinecker, C., Csmarits, B., Majdic, O. & Knapp, W. (1995) *Br J Haematol* **90**, 774-82.
- Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Majdic, O. & Knapp, W. (1998) *J Immunol* **161**, 740-8.
- Strobl, H., Takimoto, M., Majdic, O., Fritsch, G., Scheinecker, C., Hocker, P. & Knapp, W. (1993) *Blood* **82**, 2069-78.
- Wang, X., Chang, X., Facchinetti, V., Zhuang, Y. & Su, B. (2009) *J Immunol* **182**, 3597-608

Reprezentativní příklady

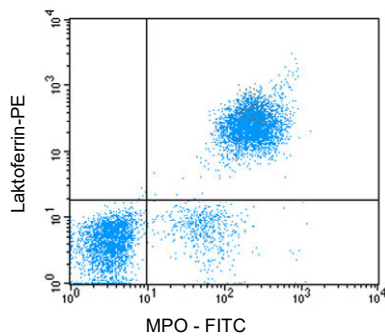
Testovaný vzorek: plná krev (EDTA), ošetřená soupravou FIX&PERM[®] pro fixaci a permeabilizaci buněk a imunobarvená na povrchový marker CD3 a cytoplazmatické antigeny laktoferin (LF), lysozym (LZ) a myeloperoxidázu (MPO-C2).



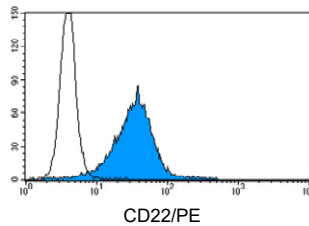
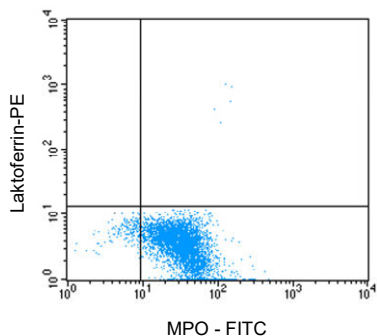
Výsledek: Dobrá kvalita intracelulárního a membránového barvení s monoklonálními protilátkami konjugovanými s PE i FITC. Charakteristiky rozptylu umožňují dobré oddělení subpopulací leukocytů.

Testované vzorky: aspiráty kostní dřeně z nemaligního případu (normální BM) a z několika pacientů s leukémií (leukemická BM, B-ALL, T-ALL a AML) ošetřené soupravou FIX&PERM[®] pro fixaci a permeabilizaci buněk a imunobarvené na povrchové markery CD3 a CD22 a cytoplazmatické antigeny laktoferin a myeloperoxidázu (MPO).

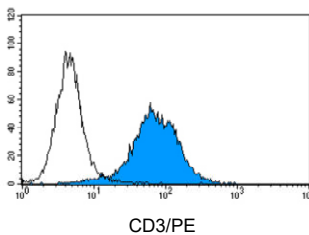
Normální kostní dřeň: Leukogate



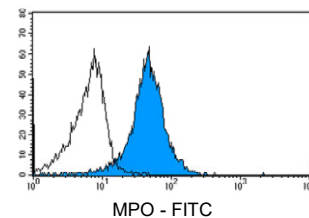
Leukemická kostní dřeň:



Cytoplazmatické barvení konjugátem CD22-PE nediferencovaných leukemických buněk typu B-ALL.



Cytoplazmatické barvení konjugátem CD3-PE povrchových CD3 negativních nediferencovaných leukemických buněk typu T-ALL.



Cytoplazmatické barvení konjugátem anti MPO-FITC nediferencovaných leukemických buněk typu AML.

Výsledek: Kvalitní intracelulární a membránové barvení monoklonálními protilátkami konjugovanými s PE a FITC, které umožňuje diferenciální diagnostiku různých typů a stadií leukémie.

Datum vydání

Verze 2: 22. května 2022

Provedené změny: Tato verze byla změněna tak, aby byla v souladu s IVD-R.