


Gebrauchsanweisung FIX&PERM®

Für die Suspensionsfärbung und durchflusszytometrische Analyse von Oberflächen- und intrazellulären Antigenen.

REF GAS-002-1-CE/IVD FIX&PERM® Kit 1000 Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit			
Lösung A (Fixierungsmedium)	1 × 100 ml	1000 Tests	
Lösung B (Permeabilisierungsmedium)	1 × 100 ml	1000 Tests	

REF GAS-002-CE/IVD FIX&PERM® Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit		
Lösung A (Fixierungsmedium)	4 × 5 ml	200 Tests
Lösung B (Permeabilisierungsmedium)	4 × 5 ml	200 Tests

REF GAS-002M-CE/IVD FIX&PERM® Proben-Kit Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit		
Lösung A (Fixierungsmedium)	1 × 5 ml	50 Tests
Lösung B (Permeabilisierungsmedium)	1 × 5 ml	50 Tests

REF GAS-002A-1-CE/IVD FIX&PERM® Lösung A (Fix) Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit		
Lösung A (Fixierungsmedium)	1 × 100 ml	1000 Tests

REF GAS-002B-1-CE/IVD FIX&PERM® Lösung B (Perm) Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit		
Lösung B (Permeabilisierungsmedium)	1 × 100 ml	1000 Tests

IVD Medizinisches Gerät für die In-vitro-Diagnostik



Nordic Immunological Laboratories BV, Nordic-MUbio, Rangeerweg 5A, 6114 BC Susteren, Niederlande

Verwendungszweck

Verwendungszweck des Geräts ist die Vorbereitung von Zellsuspensionsproben für die durchflusszytometrische Analyse. Derartige Analysen in Kombination mit (monoklonalen) Antikörpern waren bisher auf Zelloberflächenmoleküle beschränkt. Intrazelluläre Strukturen wie zytoplasmatische oder nukleare Enzyme, Onkoproteine, Zytokine und Immunglobuline wurden bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Auch eine zytoplasmatische Lokalisation von Membranmolekülen war bei durchflusszytometrischen Untersuchungen nicht möglich. Mithilfe von FIX&PERM® ist die der durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer (zytoplasmatischer und nuklearer) Antigene nun so einfach durchführbar wie eine Oberflächenantigen-Untersuchung. Die FIX&PERM®-Lösungen können sowohl in automatisierten als auch in nicht-automatisierten Umgebungen eingesetzt werden, um Proben von peripheren Blutzellen, Knochenmarkaspiraten, mononuklearen Zellsuspensionen oder aus festem Gewebe und *in vitro* kultivierten Zellen vorbereiteten Zellsuspensionen zu untersuchen.

Dieses Produkt ist ausschließlich für die professionelle Anwendung in der In-vitro-Diagnostik bestimmt.

Prinzip

FIX&PERM® enthält 1 oder 2 Lösungen: Fixierungsmedium (Lösung A) und/oder Permeabilisierungsmedium (Lösung B). Es ist für die Fixierung von Zellen in Suspension mit Lösung A und anschließende Permeabilisierung der Zellmembranen mit Lösung B bestimmt. Dieses Verfahren ermöglicht nicht nur die Immunmarkierung von Zelloberflächenantigenen, sondern bietet Antikörpern auch Zugriff auf intrazelluläre Strukturen, ohne das morphologische Streulichtverhalten der Zellen zu beeinträchtigen. Die spezifische Formulierung reduziert Hintergrundfärbungen und erlaubt das gleichzeitige Hinzufügen des Permeabilisierungsmediums und Fluorochrom-markierter Antikörper. FIX&PERM® eignet sich für die Analyse normaler und maligner Leukozytenpopulationen aus verschiedenen humanbiologischen Proben (periphere Blutzellproben, Knochenmarkaspirate, mononukleare Zellsuspensionen oder aus festem Gewebe und *in vitro* kultivierten Zellen vorbereitete Zellsuspensionen) mittels Durchflusszytometrie. Die FIX&PERM®-Lösungen sind für die Verwendung mit allen handelsüblichen Durchflusszytometern geeignet.

INHALT

Mitgelieferte Materialien

REF GAS-002-1-CE/IVD FIX&PERM® Kit 1000 Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit

Lösung A

Lösung A (Fixierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 4–10 % Formaldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung
1 × 100 ml 1000 Tests

Lösung B

Lösung B (Permeabilisierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 0,05 % Natriumazid
1 × 100 ml 1000 Tests

REF GAS-002-CE/IVD FIX&PERM® Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit

Lösung A

Lösung A (Fixierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 4–10 % Formaldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung
4 × 5 ml 200 Tests

Lösung B

Lösung B (Permeabilisierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 0,05 % Natriumazid.
4 × 5 ml 200 Tests

REF GAS-002M-CE/IVD FIX&PERM® Proben-Kit Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit

Lösung A

Lösung A (Fixierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 4–10 % Formaldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung
1 × 5 ml 50 Tests

Lösung B

Lösung B (Permeabilisierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 0,05 % Natriumazid
1 × 5 ml 50 Tests

REF GAS-002A-1-CE/IVD FIX&PERM® Lösung A (Fix) Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit

Lösung A

Lösung A (Fixierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 4–10 % Formaldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung
1 × 100 ml 1000 Tests

REF GAS-002B-1-CE/IVD FIX&PERM® Lösung B (Perm) Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit

Lösung B

Lösung B (Permeabilisierungsmedium), proprietäre Zusammensetzung, enthält 0,05 % Natriumazid
1 × 100 ml 1000 Tests

Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

Geeignete Sicherheitsmaßnahmen treffen und Laborkittel, Handschuhe, Schutzbrille usw. tragen
5-ml-Glas- oder Kunststoffröhrchen
Pipetten, Vortexmischer und Zentrifuge
Durchflusszytometer und Hüllflüssigkeit
Geeignete (fluorochrome) konjugierte Antikörper
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
1-%ige Formaldehydlösung (optional)

Entnahme, Lagerung und Handhabung von Proben

Biologische Zellproben (periphere Blutzellproben, Knochenmarkaspirate, mononukleare Zellsuspensionen oder aus festem Gewebe und *in vitro* kultivierten Zellen vorbereitete Zellsuspensionen) müssen unter sterilen Bedingungen entnommen werden. Eine Antikoagulation mit EDTA oder Heparin wird empfohlen. Die Proben sind bis zur Verwendung bei Raumtemperatur zu lagern. Für optimale Ergebnisse sollten die Proben innerhalb von 24 Stunden verarbeitet und analysiert werden. Proben mit einer hohen Anzahl von nicht-lebensfähigen Zellen können zu falschen Ergebnissen führen. In diesen Fällen ist die Bestimmung der Zellviabilität in einer separaten Probe z. B. mit Propidiumiodid ohne Fixierung und Permeabilisierung mit FIX&PERM® erforderlich. Alle biologischen Proben sind mit Vorsicht zu behandeln. Sie sind stets als potenziell infektiös zu betrachten. Geeignete Sicherheitsmaßnahmen treffen und Handschuhe, Laborkittel usw. tragen.

Fixierungs-, Permeabilisierungs- und Färbeverfahren

Die FIX&PERM®-Lösungen sind gebrauchsfertig.

- Für jede zu analysierende Probe 50 µl Vollblut, Knochenmarkaspirat, mononukleare Zellsuspension oder aus festem Gewebe und *in vitro* kultivierten Zellen vorbereitete Zellsuspension in ein 5-ml-Röhrchen geben
- 100 µl Lösung A hinzugeben (Fixierungsmedium, Lagerung und Verwendung bei Raumtemperatur)
- 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren
- 5 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung hinzugeben und die Zellen 5 Minuten lang bei 300 x g zentrifugieren
- Überstand entfernen und zum Zellpellet 100 µl Lösung B (Permeabilisierungsmedium) und 20 µl des geeigneten Antikörperkonjugats hinzugeben
- Bei geringer Geschwindigkeit 1 bis 2 Sekunden lang im Vortexmischer schütteln
- 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren
- Die Zellen wie oben beschrieben mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung waschen

- Überstand entfernen und Zellen zur sofortigen Analyse in Hüllflüssigkeit resuspendieren oder in 0,5 ml 1,0 %igem Formaldehyd resuspendieren und bei 2 bis 8 °C im Dunkeln lagern. Fixierte Zellen innerhalb von 24 Stunden analysieren

Anmerkungen: In speziellen Fällen (verdünnte Knochenmarksproben, andere Proben mit schwach löslichem Protein) kann das Zufügen von Plasmakomponenten vor der FIX&PERM®-Behandlung von Vorteil sein, um ein Milieu zu schaffen, das antikoaguliertem Blut ähnelt. Dazu empfehlen wir den Zusatz von IgG-Präparaten (z. B. Beriglobin P, ZLB Behring, Endkonzentration 10 mg/ml) und humanem Serumalbumin (z. B. humanes Albumin „Behring“ 20 % – Infusionslösung, Endkonzentration 40 mg/ml).

Leistungsmerkmale

FIX&PERM® hat in zahlreichen Publikationen (siehe ausgewählte Referenzen unten) gezeigt, dass es eine erfolgreiche Immunfärbung von Zelloberflächenmarkern und intrazellulären Antigenen in verschiedenen aus peripherem Blut oder Knochenmark gewonnenen Zelltypen ermöglicht, ohne das Streulichtverhalten dieser Zellen zu beeinträchtigen. Daher können die unterschiedlichen Zelltypen und ihre Reifungsstadien mittels durchflusszytometrischer Verfahren in normalem und (prä)malignem Blut und Knochenmarkaspiraten quantifiziert werden. Beispielhafte Abbildungen der repräsentativen Leistung sind unten aufgeführt. Die Leistung jeder FIX&PERM®-Charge wird durch Fixierung und Permeabilisierung von gut definierten Blutproben repräsentativer Spender und anschließenden Vergleich des Vorwärts- und Seitwärts-Streulichts der erhaltenen Leukozyten sowie anhand der Immunmarkierungs-Effizienz für verschiedene membranöse und zytoplasmatische Antigene ermittelt. Die zwischen den aufeinanderfolgenden Chargen festgestellten Abweichungen liegen bei allen sieben Parametern unter 10 %.

Grenzen des Verfahrens

Mithilfe von FIX&PERM® ist die durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Antigene so einfach wie eine Oberflächenantigen-Untersuchung. Die einzige Voraussetzung ist die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper-Konjugate. Die meisten verfügbaren (monoklonalen) Antikörper-Konjugate sind mit FIX&PERM® kompatibel. Einige Determinanten reagieren jedoch empfindlich auf den Fixierungsschritt. Dies und die optimale Fixierungszeit müssen für jede Lösung getestet werden. Im Folgenden sind einige Beispiele für die Färbung mit Antikörper-Konjugaten dargestellt.

Die FIX&PERM®-Lösungen sind für die Verwendung mit allen handelsüblichen Durchflusszytometern geeignet. Die Einstellung und Kompensation sollte gemäß den Herstellerangaben erfolgen. Die Durchflusszytometrie darf nur von professionellen Nutzern durchgeführt werden. Eine ungenaue Einstellung des Durchflusszytometers, eine inkorrekte Kompensation von in andere Kanäle eindringender Fluoreszenz und eine fehlerhafte Positionierung von Regionen können zu falschen Ergebnissen führen. Die Lyse roter Blutkörperchen kann durch verschiedene Ursachen verhindert werden. In solchen Fällen wird empfohlen, vor dem Färben mononukleare Zellen (MNC) durch Dichtegradienten-Zentrifugation zu isolieren. Die Ergebnisse sind korrekt und reproduzierbar, sofern die Verfahren den technischen Empfehlungen und der guten Laborpraxis entsprechen. Die FIX&PERM®-Lösungen werden in einer Konzentration bereitgestellt, die die Fixierung und Permeabilisierung humaner hämatopoetischer Zellen ermöglicht. Daher wird dringend empfohlen, sich bezüglich der Konzentrationen und Menge der Zellen und Antikörper genau an das Arbeitsprotokoll zu halten. Die Eigenschaften von FIX&PERM® wurden anhand von mit EDTA antikoaguliertem peripherem Blut und Knochenmarkaspiraten ermittelt.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Nur für den professionellen Gebrauch.

FIX&PERM® Lösung A enthält Formaldehyd und ist als gesundheitsschädlich gekennzeichnet. Formaldehyd ist toxisch, allergen und potenziell krebserregend. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung stets vermeiden. Es werden angemessene Arbeitsverfahren empfohlen. Personen unter 18 Jahren ist es grundsätzlich nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten. Benutzer müssen sorgfältig in die richtigen Arbeitsverfahren eingewiesen und über die gefährdenden Eigenschaften des Produktes und die geltenden Sicherheitsvorschriften informiert werden. Weitere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt (SDB) zu entnehmen. Altbestände und Restmengen des Produkts sind gemäß den geltenden lokalen Vorschriften zu entsorgen.

Schwerwiegende Vorfälle im Zusammenhang mit dem Gerät sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaats zu melden, in dem sich der Benutzer und/oder der Patient befinden.

Nur für Lösung A: gefährlicher Inhaltsstoff 4–10 % Formaldehyd



Gefahr

H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)

H350: Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen

P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen

P280: Schutzhandschuhe/Schutzbekleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen

P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen

P333+P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen

P362+P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen

Lagerung

FIX&PERM[®]-Lösungen sind bei Raumtemperatur (18-24 °C) zu lagern und zu verwenden. Nicht einfrieren. Stabilität der Lösung: Das Haltbarkeitsdatum ist auf der Flasche aufgedruckt. Die Verwendung der Lösung nach dem Haltbarkeitsdatum wird nicht empfohlen. Wenn die Lösung unter Bedingungen gelagert wird, die von den Vorgaben abweichen, müssen die Bedingungen vom Benutzer kontrolliert werden. Die Lösung nicht verwenden, wenn Ablagerungen oder Verfärbungen auftreten.

Die Lagerbedingungen für geöffnete Flaschen entsprechen denen für geschlossene Flaschen.

Sollten unerwartete Ergebnisse erzielt werden, die nicht auf Abweichungen im Laborverfahren zurückzuführen sind, kontaktieren Sie uns bitte.

Gewährleistung

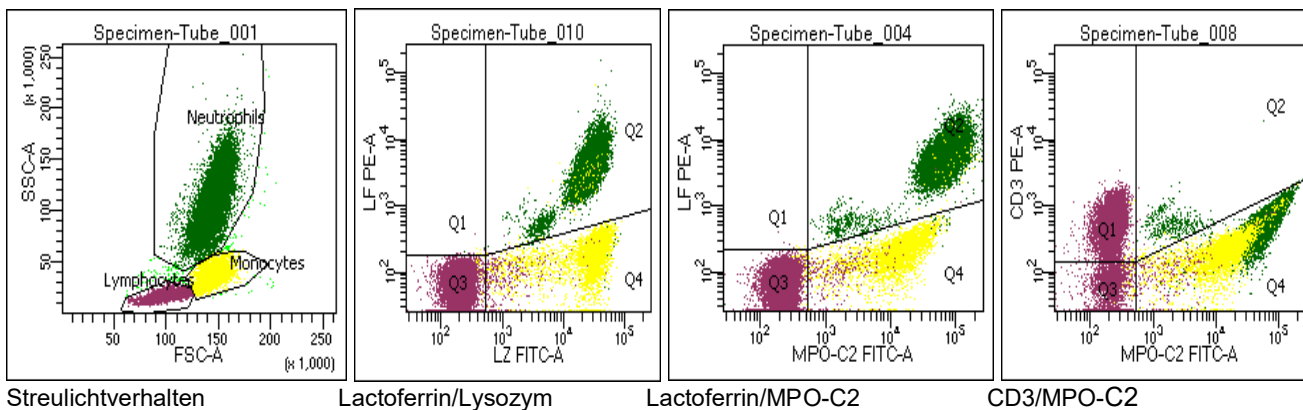
Für dieses Produkt wird nur gewährleistet, dass die Menge und der Inhalt zum Zeitpunkt der Lieferung an den Kunden den Angaben auf dem Etikett entsprechen. Es wird keine über die Beschreibung auf dem Produktetikett hinausgehende ausdrückliche oder implizite Gewährleistung gegeben. Nordic-MUBio verpflichtet sich lediglich, die Produkte auszutauschen oder den Kaufpreis zu erstatten. Nordic-MUBio haftet nicht für Sachschäden, Personenschäden oder finanzielle Verluste, die durch das Produkt verursacht werden.

Ausgewählte Referenzen

- Groeneveld, K., te Marvelde, J. G., van den Beemd, M. W., Hooijkaas, H., van Dongen, J. J. (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., Karaszi, E., Menendez, P., Ciudad, J., Rivas, R. & Orfao, A. (2000) *J Immunol Methods* **242**, 53-65.
- Kline, M. P., Rajkumar, S. V., Timm, M. M., Kimlinger, T. K., Haug, J. L., Lust, J. A., Greipp, P. R., 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.
- Konikova, E., Glasova, M., Kusenda, J. & Babusikova, 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., Vanblarcum, R. B. Y., Drent, R. J. M., Boonen, B. T., van Hemert, W. L. W., Ramaekers, F. C. S., Hopman, A. H. N., Leers, M. P. G. *Cytometry A* (2022) in press.
- Mestrum, S. G. C., de Wit, N. C. J., Drent, R. J. M., Hopman, A. H. N., Ramaekers, F. C. S., Leers, M. P. G. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(3):322-330.
- Mestrum, S. G. C., Cremers, E. M. P., de Wit, N. C. J., Drent, R. J. M., Ramaekers, F. C. S., Hopman, A. H. N., Leers, M. P. G. *Leuk Res.* 2022;113:106789.
- Mestrum, S. G. C., Cremers, E. M. P., de Wit, N. C. J., Drent, R. J. M., Ramaekers, F. C. S., Hopman, A. H. N., Leers, M. P. G. *Data Brief.* 2022 Feb 22;41:107976
- Nakase, K., Sartor, M. & Bradstock (1998) *Cytometry* **34**, 198-202.
- Nies, K. P. H., Kraaijvanger, R., Lindelauf, K. H. K., Drent, R. J. M. R., Rutten, R. M. J., Ramaekers, F. C. S., Leers, M. P. G. *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

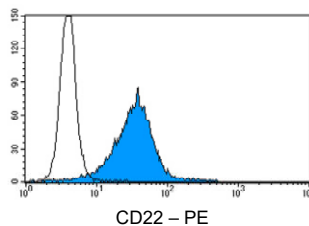
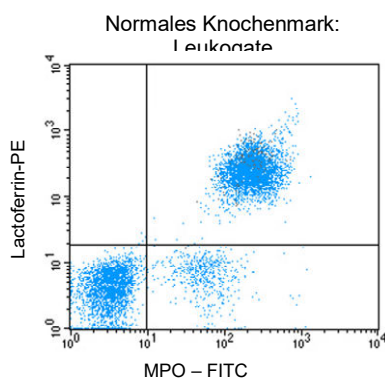
Repräsentative Beispiele

Getestete Probe: Vollblut (EDTA), behandelt mit dem FIX&PERM[®] Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit und immungefärbt für Oberflächenmarker CD3 und die zytoplasmatischen Antigene Lactoferrin (LF), Lysozym (LZ) und Myeloperoxidase (MPO-C2)

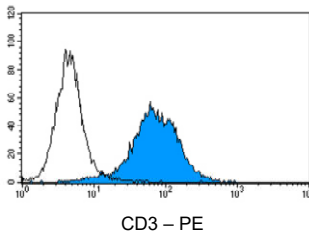
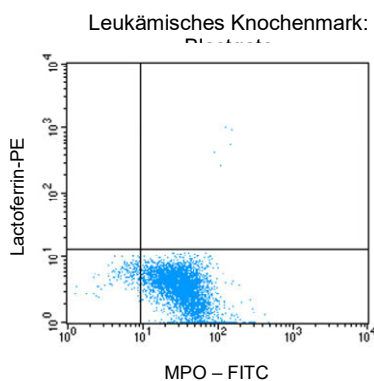


Ergebnis: Intrazelluläre und membranöse Färbemuster von guter Qualität sowohl mit PE- als auch mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern. Streulichtverhalten ermöglicht eine gute Trennung von Leukozyten-Subpopulationen.

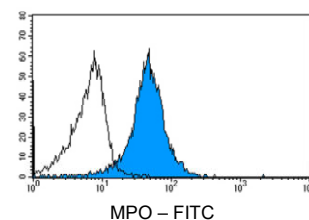
Getestete Proben: Knochenmarkspirate von einem nicht-malignen Fall (normales KM) und von verschiedenen Leukämiepatienten (leukämisches KM, B-ALL, T-ALL und AML), behandelt mit dem FIX&PERM[®] Zellfixierungs- und -permeabilisierungskit und immungefärbt für die Oberflächenmarker CD3 und CD22 und die zytoplasmatischen Antigene Lactoferrin und Myeloperoxidase (MPO)



Zytoplasmatische Färbung mit CD22-PE-Konjugat von undifferenzierten Leukämiezellen vom Typ B-ALL



Zytoplasmatische Färbung mit CD3-PE-Konjugat von Oberflächen-CD3-negativen undifferenzierten Leukämiezellen vom Typ T-ALL



Zytoplasmatische Färbung mit Anti-MPO-FITC-Konjugat von undifferenzierten Leukämiezellen vom Typ AML

Ergebnis: Intrazelluläre und membranöse Färbemuster von guter Qualität sowohl mit PE- als auch mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern, die eine Differentialdiagnose der verschiedenen Typen und Stadien von Leukämie ermöglichen.

Erstelldatum

Version 2: 22. Mai 2022

Änderungen: Diese Version wurde an die IVDR-Kriterien angepasst.