

Instrucciones de uso FIX&PERM®

Para tinciones en suspensión y análisis de citometría de flujo de antígenos de membrana de superficie e intracelulares.

REF **GAS-002-1-CE/IVD** FIX&PERM® Kit 1000 Kit de fijación y permeabilización celular

Solución A (Medio de fijación)	1 x 100 ml	1000 Tests
Solución B (Medio de permeabilización)	1 x 100 ml	1000 Tests



REF **GAS-002-CE/IVD** FIX&PERM® Kit de fijación y permeabilización celular

Solución A (Medio de fijación)	4 x 5 ml	200 Tests
Solución B (Medio de permeabilización)	4 x 5 ml	200 Tests

REF **GAS-002M-CE/IVD** FIX&PERM® Kit de muestra Kit de fijación y permeabilización celular

Solución A (Medio de fijación)	1 x 5 ml	50 Tests
Solución B (Medio de permeabilización)	1 x 5 ml	50 Tests

REF **GAS-002A-1-CE/IVD** FIX&PERM® Solución A (Fij) Kit de fijación y permeabilización celular

Solución A (Medio de fijación)	1 x 100 ml	1000 Tests
--------------------------------	------------	------------

REF **GAS-002B-1-CE/IVD** FIX&PERM® Solución B (Perm) Kit de fijación y permeabilización celular

Solución B (Medio de permeabilización)	1 x 100 ml	1000 Tests
--	------------	------------

IVD Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (IVD o In Vitro Diagnostic)

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

Finalidad prevista

La finalidad prevista del dispositivo es preparar muestras de suspensión de células para su análisis por citometría de flujo. Durante mucho tiempo, dichos análisis combinados con anticuerpos (monoclonales) se limitaban a las moléculas de la superficie celular. Las estructuras intracelulares, como las enzimas citoplásmicas o nucleares, las oncoproteínas, las citoquinas, las inmunoglobulinas, etc., se excluían en gran medida de estos estudios. Además, las localizaciones citoplásmicas de moléculas de membrana bien establecidas también se excluían de los estudios de citometría de flujo. Al usar FIX&PERM®, el análisis de citometría de flujo de antígenos intracelulares (citoplásmicos y nucleares) se ha convertido en algo tan fácil como los estudios de antígenos de superficie. Las soluciones FIX&PERM® se pueden aplicar, tanto de manera automatizada como no automatizada, para estudiar muestras de células de sangre periférica, aspirados de médula ósea, suspensiones de células mononucleares o suspensiones celulares preparadas a partir de tejidos sólidos y células cultivadas in vitro.

Este producto está destinado, exclusivamente a un uso profesional de diagnóstico in vitro.

Principio

FIX&PERM® contiene 1 o 2 soluciones: medio de fijación (Solución A) y/o Medio de permeabilización (Solución B). Está destinado a (en primer lugar) fijar las células en suspensión con la Solución A y (a continuación) a permeabilizar las membranas celulares con la Solución B. Este procedimiento no solo permite la inmunotinción de los antígenos de la superficie celular, sino que también da acceso a las estructuras intracelulares a los anticuerpos, y deja intactas las características morfológicas de dispersión de las células. La formulación específica reduce la tinción de fondo y permite la adición simultánea del medio de permeabilización y de los anticuerpos marcados con fluorocromo. FIX&PERM® es un producto adecuado para el análisis de poblaciones leucocitarias normales y malignas derivadas de diversas muestras biológicas humanas (muestras de células de sangre periférica, aspirados de médula ósea, suspensiones de células mononucleares o suspensiones celulares preparadas a partir de tejido sólido, y de células cultivadas in vitro) mediante citometría de flujo. Las soluciones FIX&PERM® están diseñadas para su uso con todos los citómetros de flujo disponibles en el mercado.

CONTENID

Materiales suministrados

REF GAS-002-1-CE/IVD FIX&PERM® Kit 1000 Kit de fijación y permeabilización celular
 Solución A (Medio de fijación) de composición propia, contiene 4-10 % de formaldehído en solución salina tamponada con fosfato.

1 x 100 ml 1000 Tests

Solución B (Medio de permeabilización) composición propia, contiene 0,05 % de azida sódica.
 Solución 1 x 100 ml 1000 Tests

REF GAS-002-CE/IVD FIX&PERM® Kit de fijación y permeabilización celular
 Solución A (Medio de fijación) de composición propia, contiene 4-10 % de formaldehído en solución salina tamponada con fosfato.

4 x 5 ml ml 200 Tests

Solución B (Medio de permeabilización) composición propia, contiene 0,05 % de azida sódica.
 Solución 4 x 5 ml ml 200 Tests

REF GAS-002M-CE/IVD FIX&PERM® Kit de muestra Kit de fijación y permeabilización celular
 Solución A (Medio de fijación) de composición propia, contiene 4-10 % de formaldehído en solución salina tamponada con fosfato.

1 x 5 ml 50 Tests

Solución B (Medio de permeabilización) composición propia, contiene 0,05 % de azida sódica.
 Solución 1 x 5 ml 50 Tests

REF GAS-002A-1-CE/IVD FIX&PERM® Solución A (Fij) Kit de fijación y permeabilización celular
 Solución A (Medio de fijación) de composición propia, contiene 4-10 % de formaldehído en solución salina tamponada con fosfato.

1 x 100 ml 1000 Tests

REF GAS-002B-1-CE/IVD FIX&PERM® Solución B (Perm) Kit de fijación y permeabilización celular

Solución B (Medio de permeabilización) composición propia, contiene 0,05 % de azida sódica.
 Solución 1 x 100 ml 1000 Tests

Materiales necesarios, pero no suministrados

Tome las precauciones de seguridad adecuadas, como llevar una bata de laboratorio, guantes, gafas de seguridad, etc.
 Tubos de vidrio o plástico de 5 ml
 Pipetas, Vortex y centrifugadora
 Citómetro de flujo y fluido envolvente
 Anticuerpos adecuadamente conjugados (con fluorocromo)
 Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
 Solución de formaldehído al 1% (opcional)

Recogida, almacenamiento y manipulación de muestras

Las muestras de células biológicas (muestras de células de sangre periférica, aspirados de médula ósea, suspensiones de células mononucleares o suspensiones celulares preparadas a partir de tejido sólido y células cultivadas in vitro) se deben recoger en condiciones estériles. Se recomienda la anticoagulación con EDTA o heparina. Las muestras se deben conservar a temperatura ambiente hasta su uso. Para obtener resultados óptimos, las muestras se deben procesar y analizar en un plazo de 24 horas. Las muestras con un alto número de células no viables podrían causar resultados falsos. Por consiguiente, estos casos requieren la determinación de la viabilidad celular en una muestra separada con, por ejemplo, yoduro de propidio sin fijación y permeabilización con FIX&PERM®. Todas las muestras biológicas se deben manipular con precaución. Considérelas siempre como potencialmente infecciosas. Aplique las precauciones adecuadas, como guantes, bata de laboratorio, etc.

Procedimiento de fijación, permeabilización y tinción

Las soluciones FIX&PERM® están listas para su uso.

- Para cada muestra que se tiene que analizar, añada 50 µl de sangre total, aspirado de médula ósea, suspensión de células mononucleares o suspensiones celulares preparadas a partir de tejido sólido y células cultivadas in vitro en un tubo de 5 ml
- Añada 100 µl de Solución A (medio de fijación, almacenado y utilizado a temperatura ambiente)
- Incube la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente
- Añada 5 ml de solución salina tamponada con fosfato y centrifugue las células durante 5 minutos a 300xg
- Elimine el sobrenadante y añada al pellet celular 100 µl de Solución B (medio de permeabilización) y 20 µl del conjugado de anticuerpos adecuado
- Utilice el Vortex a baja velocidad durante 1-2 segundos
- Incube la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente
- Lave las células con solución salina tamponada con fosfato tal y como se ha descrito anteriormente

- Elimine el sobrenadante y resuspenda las células en fluido envolvente para su análisis inmediato o resuspenda las células en 0,5 ml de formaldehído al 1,0 % y almacénelas a 2-8 °C en condiciones de oscuridad. Analice las células fijadas en un plazo de 24 horas.

Comentarios: en casos especiales (muestras de médula ósea diluidas, otras muestras que contengan pocas proteínas solubles) podría ser beneficioso reponer componentes plasmáticos antes del tratamiento FIX&PERM®, a fin de crear un medio que se asemeje más a la situación de la sangre anticoagulada. Para ese propósito, se recomienda la adición de preparaciones de IgG (por ejemplo, Beriglobulina P, ZLB Behring, concentración final 10mg/ml) y albúmina de suero humano (por ejemplo, albúmina humana «Behring» 20 % - solución de infusión, concentración final 40mg/ml).

Características de desempeño

FIX&PERM® ha demostrado en un gran número de publicaciones (véanse las referencias seleccionadas a continuación) que permite la inmunotinción satisfactoria de los marcadores de la superficie celular y de los antígenos intracelulares en diferentes tipos de células derivadas de la sangre periférica o de la médula ósea mientras que, al mismo tiempo, deja intactas las características de dispersión de estos tipos de células. Como resultado de ello, los diferentes tipos de células y sus etapas de maduración se pueden cuantificar mediante el uso de técnicas de citometría de flujo en sangre normal y (pre)maligna y en aspirados de médula ósea. Véanse los siguientes ejemplos para ilustrar las características de desempeño representativas. El desempeño de cada lote de FIX&PERM® se determina mediante la fijación y permeabilización de muestras de sangre bien definidas de donantes representativos y la posterior comparación de las características de dispersión frontal y lateral de los leucocitos obtenidos, así como la eficacia de la inmunotinción para varios antígenos membranosos y citoplasmáticos. Las desviaciones de los 7 parámetros determinados entre lotes posteriores son todas inferiores al 10 %.

Limitaciones de la técnica

Con FIX&PERM®, el análisis de citometría de flujo de antígenos intracelulares se ha convertido en algo tan fácil como los estudios de antígenos de superficie. El único requisito previo es la disponibilidad de conjugados de anticuerpos adecuados. La mayoría de los conjugados de anticuerpos (monoclonales) disponibles se pueden utilizar con FIX&PERM®. No obstante, algunos determinantes son sensibles al paso de fijación implicado. Esto y el tiempo de fijación óptimo son aspectos que se deben probar para cada solución. A continuación se muestran algunos ejemplos de tinción con conjugados de anticuerpos.

Las soluciones FIX&PERM® están diseñadas para su uso con todos los citómetros de flujo disponibles en el mercado. La alineación y la compensación se deben realizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La citometría de flujo solo debe ser realizada por usuarios profesionales. Una alineación incorrecta del citómetro de flujo, una compensación inexacta de la fluorescencia que se filtra en otros canales, así como un posicionamiento incorrecto de las regiones, pueden dar lugar a resultados falsos. La lisis de los glóbulos rojos puede ser imposible por diversas razones. En estos casos, se recomienda aislar las células mononucleares (MNC, por sus siglas en inglés) mediante centrifugación en gradiente de densidad antes de la tinción. Los resultados serán correctos y reproducibles siempre que los procedimientos utilizados respeten las recomendaciones técnicas y cumplan las buenas prácticas de laboratorio. Las soluciones FIX&PERM® se suministran en una concentración que permitirá fijar y permeabilizar las células hematopoyéticas humanas. Por lo tanto, se recomienda encarecidamente respetar el protocolo de trabajo en cuanto a la concentración y el volumen en relación con las células y el anticuerpo. Las propiedades de FIX&PERM® se han determinado utilizando sangre periférica y aspirados de médula ósea anticoagulados con EDTA.

Advertencias y precauciones

Solo para usuarios profesionales.

La Solución A de FIX&PERM® contiene formaldehído y está etiquetada como: nociva. El formaldehído es tóxico, alergénico y se sospecha que es cancerígeno. Nunca se debe pipetear por la boca y se debe evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Se recomienda utilizar procedimientos de manipulación adecuados. Como norma principal, los menores de 18 años no pueden trabajar con este producto. Los usuarios deben ser cuidadosamente instruidos en el procedimiento de trabajo adecuado, las propiedades peligrosas del producto y las instrucciones de seguridad necesarias. Consulte la ficha de datos de seguridad (FDS) para obtener información adicional. Elimine los restos del producto de acuerdo con la normativa local.

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto se deberá notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro de la UE en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

Solo para la solución A: contenido de sustancia peligrosa 4-10 % de formaldehído



Peligro

H341: Se sospecha que causa defectos genéticos (indíquese la vía de exposición si se ha demostrado concluyentemente que ninguna otra vía es peligrosa)

H350: Susceptible de provocar defectos genéticos (indíquese la vía de exposición si se ha demostrado concluyentemente que ninguna otra vía es peligrosa)

H317: Puede provocar una reacción cutánea alérgica

P201: Procurarse las instrucciones antes del uso.

P280: Usar guantes protectores/ropa protectora/protección ocular/protección para la cara.

P308+P313: EN CASO de exposición demostrada o supuesta: consultar a un médico.

P333+P313: En caso de irritación cutánea o sarpullido: consultar a un médico.

P362+P364: Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de volverla a usar.

Almacenamiento

Las soluciones FIX&PERM[®] se deben almacenar y utilizar a temperatura ambiente (18-24 °C). No congelar. Estabilidad de la solución: consulte la fecha de caducidad impresa en el vial. No se recomienda el uso de la solución después de la fecha de caducidad. Si las soluciones se almacenan en condiciones distintas a las especificadas, el usuario debe comprobar las condiciones. Las soluciones no se deben utilizar si se forma un precipitado o se produce una decoloración.

Las condiciones de almacenamiento después de la apertura de los viales son las mismas que para los viales sin abrir.

Si se obtienen resultados inesperados que no se pueden atribuir a diferencias en los procedimientos de laboratorio, póngase en contacto con nosotros.

Garantía

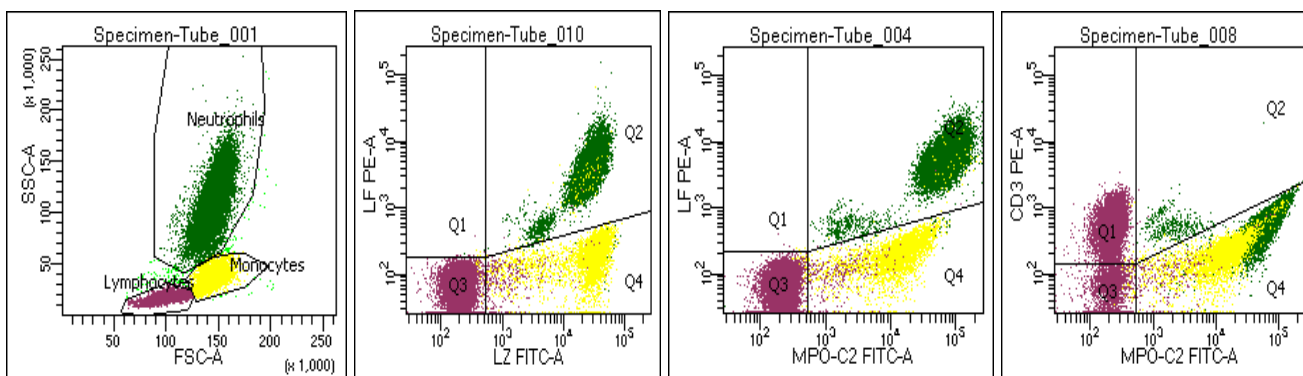
Los productos que se venden en el presente documento solo están garantizados por la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta en el momento de la entrega al cliente. No hay garantías, expresas o implícitas, que se extiendan más allá de la descripción en la etiqueta del producto. La única responsabilidad de Nordic-MUBio se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra. Nordic-MUBio no es responsable de los daños materiales, personales o económicos causados por el producto.

Referencias seleccionadas

- 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., Karaszi, 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.
- 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., Degraeve, 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) in press.
- 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.* 2022 Feb 22;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

Ejemplos representativos

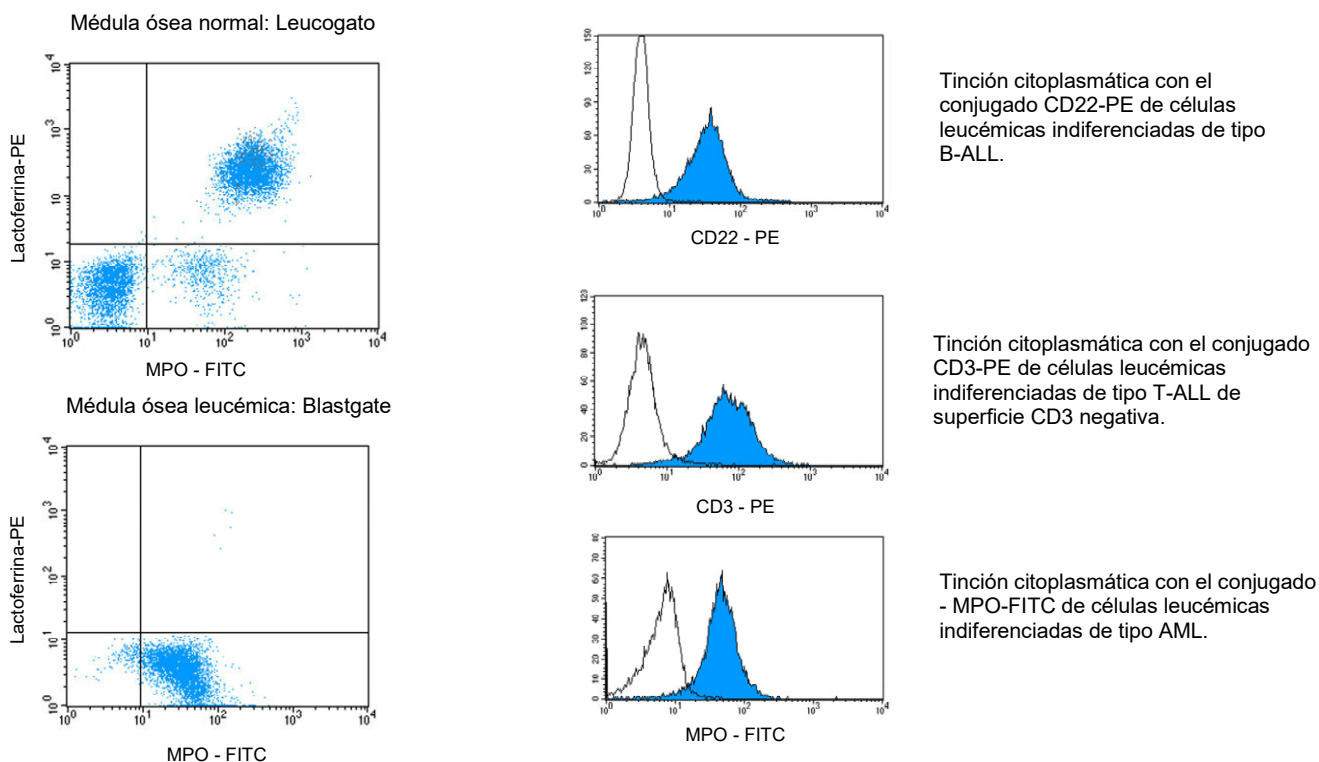
Muestra analizada: sangre total (EDTA), tratada con el kit de fijación y permeabilización celular FIX&PERM[®] e inmunotinción para el marcador de superficie CD3, y los antígenos citoplasmáticos Lactoferrina (LF), Lisozima (LZ) y Mieloperoxidasa (MPO-C2).



Características de la dispersión Lactoferrina/ Llisozima Lactoferrina/MPO-C2 CD3/MPO-C2

Resultado: patrones de tinción intracelular y membranosa de buena calidad con anticuerpos monoclonales conjugados con PE y FITC. Las características de dispersión permiten una buena separación de las subpoblaciones de leucocitos.

Muestras analizadas: aspirados de médula ósea de un caso no maligno (médula ósea normal), y de varios pacientes con leucemia (médula ósea leucémica, B-ALL, T-ALL y AML) tratados con el kit de fijación y permeabilización celular FIX&PERM® e inmunotinción para los marcadores de superficie CD3 y CD22, y los antígenos citoplasmáticos Lactoferrina y Mieloperoxidasa (MPO).



Resultado: patrones de tinción intracelular y membranosa de buena calidad con anticuerpos monoclonales conjugados con PE y FITC que permiten el diagnóstico diferencial de los distintos tipos y estadios de leucemia.

Fecha de publicación

Versión 2: 22 de mayo de 2022

Modificaciones introducidas: esta versión se ha modificado para cumplir con el IVD-R