


Instructions d'utilisation FIX&PERM®

Pour la coloration des suspensions et les analyses de cytométrie en flux des antigènes intracellulaires et de surface.

REF GAS-002-1-CE/IVD FIX&PERM® Kit 1000 – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires			
Solution A (milieu de fixation)	1 x 100 ml	1000 tests	
Solution B (milieu de perméabilisation)	1 x 100 ml	1000 tests	

REF GAS-002-CE/IVD FIX&PERM® – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires		
Solution A (milieu de fixation)	4 x 5 ml	200 tests
Solution B (milieu de perméabilisation)	4 x 5 ml	200 tests

REF GAS-002M-CE/IVD FIX&PERM® kit d'échantillonnage – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires		
Solution A (milieu de fixation)	1 x 5 ml	50 tests
Solution B (milieu de perméabilisation)	1 x 5 ml	50 tests

REF GAS-002A-1-CE/IVD FIX&PERM® Solution A (Fix) – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires		
Solution A (milieu de fixation)	1 x 100 ml	1000 tests

REF GAS-002B-1-CE/IVD FIX&PERM® Solution B (Perm) – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires		
Solution B (milieu de perméabilisation)	1 x 100 ml	1000 tests

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

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

Utilisation prévue

L'utilisation prévue du dispositif est la préparation d'échantillons de suspensions cellulaires pour l'analyse de cytométrie en flux. Ces analyses combinées avec des anticorps (monoclonaux) ont longtemps été limitées aux molécules de la surface cellulaire. Les structures intracellulaires telles que les enzymes cytoplasmiques ou nucléaires, les oncoprotéines, les cytokines, les immunoglobulines, etc. étaient largement exclues de telles études. Les localisations cytoplasmiques de molécules bien implantées de la membrane étaient également exclues des études de cytométrie en flux. Avec FIX&PERM®, l'analyse de cytométrie en flux des antigènes (cytoplasmiques et nucléaires) intracellulaires est devenue aussi facile que l'étude des antigènes de surface. Les solutions FIX&PERM® peuvent être appliquées dans un contexte automatisé ou non automatisé pour étudier des échantillons de cellules de sang périphérique, des aspirats de moelle osseuse, des suspensions de cellules mononucléaires ou des suspensions de cellules préparées à partir de tissus solides et de cellules cultivées *in vitro*.

Ce produit est exclusivement réservé au diagnostic *in vitro* professionnel.

Principe

FIX&PERM® contient 1 ou 2 solutions : milieu de fixation (solution A) et/ou milieu de perméabilisation (solution B). Il est destiné (d'abord) à fixer les cellules en suspension avec la solution A et (ensuite) à perméabiliser les membranes cellulaires avec la solution B. Non seulement cette procédure permet l'immunocoloration des antigènes de surface des cellules, mais elle donne également aux anticorps l'accès aux structures intracellulaires tout en laissant intactes les caractéristiques de dispersion morphologique des cellules. La formulation spécifique réduit la coloration d'arrière-plan et permet l'ajout simultané du milieu de perméabilisation et d'anticorps marqués au fluorochrome. FIX&PERM® convient à l'analyse de populations de leucocytes normaux et malins provenant de différents échantillons biologiques humains (échantillons de cellules de sang périphérique, aspirats de moelle osseuse, suspensions de cellules mononucléaires ou suspensions de cellules préparées à partir de tissus solides et de cellules cultivées *in vitro*) en utilisant la cytométrie en flux. Les solutions FIX&PERM® peuvent être utilisées avec tous les cytomètres en flux disponibles dans le commerce.

CONTENU

Éléments fournis

REF **GAS-002-1-CE/IVD** FIX&PERM® Kit 1000 – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires
 Solution A (milieu de fixation) composition exclusive, contient 4-10 % de formaldéhyde dans une solution saline tamponnée au phosphate.

1 x 100 ml 1000 tests

Solution B Solution B (milieu de perméabilisation) composition exclusive, contient 0,05 % d'azoture de sodium.
 1 x 100 ml 1000 tests

REF **GAS-002-CE/IVD** FIX&PERM® – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires

Solution A (milieu de fixation) composition exclusive, contient 4-10 % de formaldéhyde dans une solution saline tamponnée au phosphate.

4 x 5 ml 200 tests

Solution B Solution B (milieu de perméabilisation) composition exclusive, contient 0,05 % d'azoture de sodium.
 4 x 5 ml 200 tests

REF **GAS-002M-CE/IVD** FIX&PERM® kit d'échantillonnage – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires

Solution A (milieu de fixation) composition exclusive, contient 4-10 % de formaldéhyde dans une solution saline tamponnée au phosphate.

1 x 5 ml 50 tests

Solution B Solution B (milieu de perméabilisation) composition exclusive, contient 0,05 % d'azoture de sodium.
 1 x 5 ml 50 tests

REF **GAS-002A-1-CE/IVD** FIX&PERM® Solution A (Fix) – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires

Solution A (milieu de fixation) composition exclusive, contient 4-10 % de formaldéhyde dans une solution saline tamponnée au phosphate.

1 x 100 ml 1000 tests

REF **GAS-002B-1-CE/IVD** FIX&PERM® Solution B (Perm) – kit de fixation et de perméabilisation cellulaires

Solution B (milieu de perméabilisation) composition exclusive, contient 0,05 % d'azoture de sodium.
 1 x 100 ml 1000 tests

Matériel requis mais non fourni

Utiliser les précautions de sécurité appropriées, par exemple porter une blouse de laboratoire, des gants, des lunettes de sécurité, etc.

Tubes en verre ou en plastique de 5 ml

Pipettes, vortex et centrifugeuse

Cytomètre en flux et fluide vecteur

Anticorps conjugués de manière appropriée (fluorochrome)

Solution tamponnée au phosphate (STP)

Solution de formaldéhyde 1 % (facultatif)

Collecte, stockage et manipulation des échantillons

Les échantillons biologiques de cellules (échantillons de cellules de sang périphérique, aspirats de moelle osseuse, suspensions de cellules mononucléaires ou suspensions de cellules préparés à partir de tissus solides et de cellules cultivées *in vitro*) doivent être collectés dans des conditions stériles. Une anticoagulation à l'EDTA ou à l'héparine est recommandée. Les échantillons doivent être stockés à température ambiante jusqu'à utilisation. Pour des résultats optimaux, les échantillons doivent être traités et analysés dans un délai de 24 heures. Les échantillons contenant un nombre élevé de cellules non viables peuvent fausser les résultats ; de tels cas obligent à déterminer la viabilité des cellules dans un échantillon séparé avec, par exemple, de l'iodure de propidium sans fixation et perméabilisation avec FIX&PERM®. Tous les échantillons biologiques doivent être manipulés avec précaution. Toujours considérer qu'ils peuvent présenter une infectiosité potentielle. Utiliser des précautions appropriées (gants, blouse de laboratoire, etc.).

Procédure de fixation, perméabilisation et coloration

Les solutions FIX&PERM® sont prêtes à l'usage.

- Pour chaque échantillon à analyser, ajouter 50 µl de sang total, aspirat de moelle osseuse, suspension de cellules mononucléaires ou suspensions de cellules préparés à partir de tissus solides et de cellules cultivées *in vitro* dans un tube de 5 ml
- Ajouter 100 µl de solution A (milieu de fixation, stocké et utilisé à température ambiante)
- Incuber 15 minutes à température ambiante
- Ajouter 5 ml de solution tamponnée au phosphate et centrifuger les cellules pendant 5 minutes à 300 xg
- Retirer le surnageant et ajouter au fragment de cellule 100 µl de solution B (milieu de perméabilisation) et 20 µl de l'anticorps conjugué approprié
- Homogénéiser au vortex à faible vitesse pendant 1-2 secondes
- Incuber 15 minutes à température ambiante
- Laver les cellules avec de la solution tamponnée au phosphate comme indiqué ci-dessus

- Retirer le surageant et resuspendre les cellules dans du fluide vecteur en vue de leur analyse immédiate ou resuspendre les cellules dans 0,5 ml de formaldéhyde 1,0 % et les stocker à 2-8 °C dans le noir. Analyser les cellules fixées dans un délai de 24 heures.

Observations : il pourrait être bénéfique pour les cas spéciaux (échantillons de moelle osseuse diluée, autres échantillons à faible teneur en protéines solubles) d'être réapprovisionné en composants du plasma avant le traitement avec FIX&PERM® afin de créer un milieu qui ressemble plus étroitement à la situation du sang anticoagulé. Pour cela, il est recommandé d'ajouter des préparations IgG (p. ex. bériglobine P, CSL Behring, concentration finale 10 mg/ml) et de sérum-albumine humaine (p. ex. albumine humaine « Behring » 20 % – solution pour infusion, concentration finale 40 mg/ml).

Caractéristiques de performances

Un grand nombre de publications (voir quelques références ci-dessous) ont montré que FIX&PERM® permet l'immunocoloration des marqueurs de surface des cellules et des antigènes intracellulaires dans différents types de cellules de sang périphérique ou de moelle osseuse, tout en laissant intactes les caractéristiques de dispersion morphologique de ces cellules. Les différents types de cellules et leurs stades de maturation peuvent ainsi être quantifiés par des techniques de cytométrie en flux dans les aspirats de moelle osseuse et le sang normal et (pré-)malin. Voir les exemples ci-dessous qui illustrent des caractéristiques de performance représentatives. Les performances de chaque lot FIX&PERM® sont déterminées par la fixation et la perméabilisation d'échantillons de sang correctement définis provenant de donneurs représentatifs et la comparaison ultérieure des caractéristiques de dispersion frontale et latérale des leucocytes obtenus, ainsi que par l'efficacité de l'immunocoloration pour plusieurs antigènes de la membrane et du cytoplasme. Les écarts déterminés pour les 7 paramètres entre des lots subséquents sont tous inférieurs à 10 %.

Limitations de la technique

Avec FIX&PERM®, l'analyse de cytométrie en flux des antigènes intracellulaires est devenue aussi facile que l'étude des antigènes de surface. La seule condition préalable est la disponibilité d'anticorps conjugués adéquats. La plupart des anticorps (monoclonaux) conjugués peuvent être utilisés avec FIX&PERM®, même si certains déterminants sont sensibles à l'étape de fixation. Ce facteur et le temps de fixation optimal doivent être testés pour chaque solution. Certains exemples de coloration avec des anticorps conjugués sont présentés ci-dessous.

Les solutions FIX&PERM® peuvent être utilisées avec tous les cytomètres en flux disponibles dans le commerce. L'alignement et la compensation doivent être réalisés conformément aux instructions du fabricant. Seuls les utilisateurs professionnels sont habilités à exécuter la cytométrie en flux. Le mauvais alignement du cytomètre en flux, le réglage imprécis des compensations de fluorescence ainsi que le positionnement incorrect des régions peuvent fausser les résultats. La lyse des globules rouges peut s'avérer impossible pour différentes raisons. Dans ce cas, il est recommandé d'isoler les cellules mononucléaires par centrifugation en gradient de densité avant la coloration. Les résultats seront corrects et reproductibles à condition que les procédures utilisées respectent les recommandations techniques et les bonnes pratiques de laboratoire. Les solutions FIX&PERM® sont fournies dans une concentration qui permet de fixer et de perméabiliser les cellules hématopoïétiques humaines. Il est donc fortement recommandé de s'en tenir au protocole de travail en ce qui concerne la concentration et le volume de cellules et d'anticorps. Les propriétés de FIX&PERM® ont été définies en utilisant des aspirats de moelle osseuse et du sang périphérique anticoagulé à l'EDTA.

Avertissements et précautions

Usage réservé aux utilisateurs professionnels.

La solution A de FIX&PERM® contient du formaldéhyde et est étiquetée comme nocive. Le formaldéhyde est toxique, allergène et potentiellement cancérigène. Ne jamais pipeter à la bouche et éviter tout contact avec les yeux, la peau et des vêtements. Il est recommandé d'utiliser des procédures de manipulation adéquates. En règle générale, les personnes de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à travailler avec ce produit. Les utilisateurs doivent être soigneusement formés à la procédure d'utilisation adéquate, aux propriétés dangereuses du produit et aux instructions de sécurité nécessaires. Se reporter à la fiche de données de sécurité pour en savoir plus. Éliminer les restes de produit conformément aux réglementations locales.

Tout incident grave en lien avec le dispositif doit être signalé au fabricant ainsi qu'aux autorités compétentes de l'État membre de l'Union européenne dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Uniquement pour la solution A : la substance dangereuse contient 4-10 % de formaldéhyde



Danger

H341 : Susceptible d'induire des anomalies génétiques (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)

H350 : Peut provoquer le cancer (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée

P201 : Se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

P308+P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin

P333+P313 : En cas d'irritation/éruption cutanée : consulter un médecin

P362+P364 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Stockage

Les solutions FIX&PERM® doivent être stockées et utilisées à température ambiante (18-24 °C). Ne pas congeler. Stabilité de la solution : se reporter à la date d'expiration imprimée sur le flacon. Il n'est pas recommandé d'utiliser la solution au-delà de la date d'expiration. Si les solutions sont stockées dans des conditions autres que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Ne pas utiliser les solutions en cas de formation d'un précipité ou de décoloration.

Les conditions de stockage après ouverture des flacons sont identiques à celles des flacons non ouverts.

En cas d'obtention de résultats imprévus qui ne peuvent pas être attribués à des différences de procédures de laboratoire, veuillez nous contacter.

Garantie

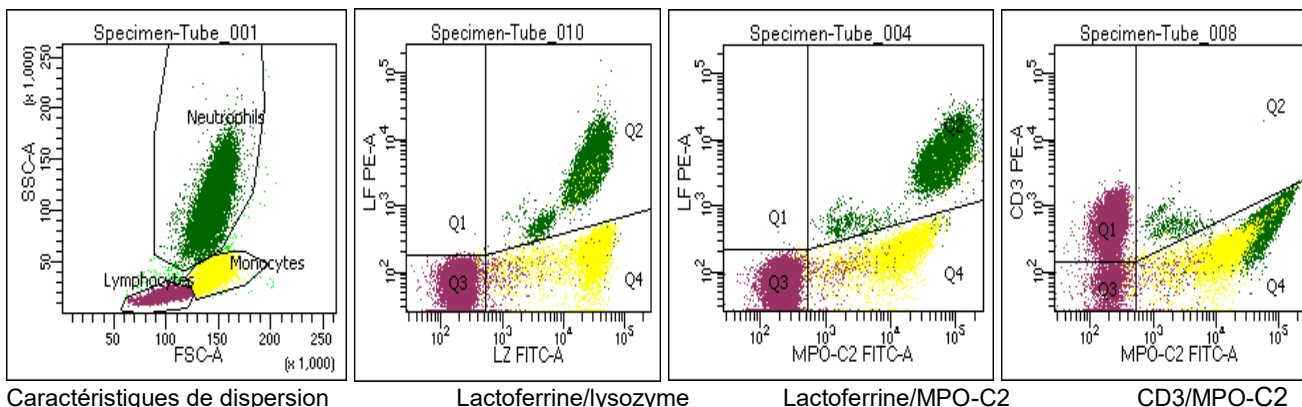
Les produits vendus en vertu des présentes sont garantis uniquement pour la conformité à la quantité et au contenu indiqués sur l'étiquette au moment de la livraison au client. Aucune garantie, expresse ou implicite, ne va au-delà de la description figurant sur l'étiquette du produit. La responsabilité de Nordic-MUBio se limite au remplacement des produits ou au remboursement du prix d'achat. Nordic-MUBio n'est pas responsable des dommages aux biens, des dommages corporels ou des pertes économiques provoqués par le produit.

Références

- 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

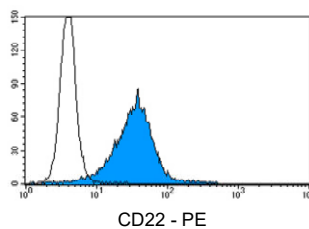
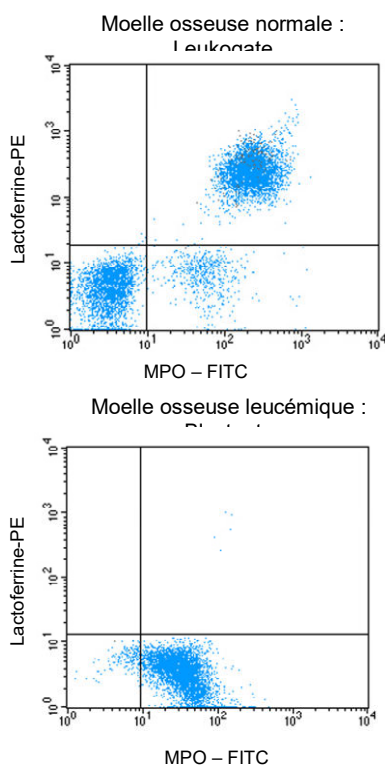
Exemples représentatifs

Échantillon testé : sang entier (EDTA) traité avec le kit de fixation et de perméabilisation FIX&PERM® et immunocoloré pour le marqueur de surface CD3 et les antigènes du cytoplasme lactoferrine (LF), lysozyme (LZ) et myéloperoxydase (MPO-C2).

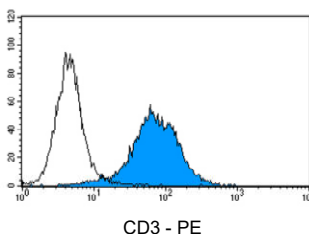


Résultat : bonnes caractéristiques de coloration intracellulaire et de coloration de la membrane avec les anticorps monoclonaux conjugués au PE et au FITC. Les caractéristiques de dispersion permettent une bonne séparation des sous-populations de leucocytes.

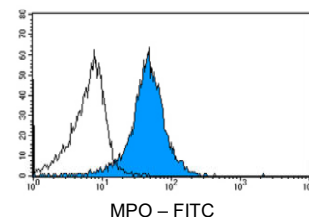
Échantillons testés : aspirats de moelle osseuse provenant d'un cas non malin (moelle osseuse normale) et de plusieurs patients souffrant de leucémie (moelle osseuse leucémique, B-ALL, T-ALL et AML) traités avec le kit de fixation et de perméabilisation cellulaires FIX&PERM® et immunocolorés pour les marqueurs de surface CD3 et CD22 et les antigènes du cytoplasme lactoferrine et myéloperoxydase (MPO).



Coloration du cytoplasme avec conjugué CD22-PE de cellules leucémiques indifférenciées de type B-ALL.



Coloration du cytoplasme avec conjugué CD3-PE de cellules leucémiques de surface indifférenciées CD3 négatives de type T-ALL.



Coloration du cytoplasme avec conjugué anti MPO-FITC de cellules leucémiques indifférenciées de type AML.

Résultat : bonnes caractéristiques de coloration intracellulaire et de coloration de la membrane avec les anticorps monoclonaux conjugués au PE et au FITC qui permettent le diagnostic différentiel de différents types et de différents stades de leucémie.

Date de publication

Version 2 : 22 mai 2022

Modifications introduites : cette version a été amendée pour être conforme à l'IVD-R.