

Bruksanvisning FIX&PERM®

För suspensionsfärgning och flödescytometriska analyser av ytmembran och intracellulära antigener.

REF GAS-002-1-CE/IVD FIX&PERM® kit 1000 Cellfixerings- och permeabiliseringskit		
Lösning A (fixeringsmedium)	1 x 100 ml	1 000 tester
Lösning B (permeabiliseringsmedium)	1 x 100 ml	1 000 tester



REF GAS-002-CE/IVD FIX&PERM® Cellfixerings- och permeabiliseringskit		
Lösning A (fixeringsmedium)	4 x 5 ml	200 tester
Lösning B (permeabiliseringsmedium)	4 x 5 ml	200 tester

REF GAS-002M-CE/IVD FIX&PERM® provkit Cellfixerings- och permeabiliseringskit		
Lösning A (fixeringsmedium)	1 x 5 ml	50 tester
Lösning B (permeabiliseringsmedium)	1 x 5 ml	50 tester

REF GAS-002A-1-CE/IVD FIX&PERM® Lösning A (Fix) Cellfixerings- och permeabiliseringskit		
Lösning A (fixeringsmedium)	1 x 100 ml	1 000 tester

REF GAS-002B-1-CE/IVD FIX&PERM® Lösning B (Perm) Cellfixerings- och permeabiliseringskit		
Lösning B (permeabiliseringsmedium)	1 x 100 ml	1 000 tester

IVD Medicinteknisk produkt för *in vitro*-diagnostik

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

Avsedd användning

Enhetens avsedda användning är att förbereda cellsuspensionsprover för cytometrianalyser. Sådana analyser kombinerade med (monoklonala) antikroppar var länge begränsade till cellens ytmolekyler. Intracellulära strukturer som cytoplasmiska eller nukleära enzymer, onkoproteiner, cytokiner, immunoglobuliner etc. uteslöts huvudsakligen från sådana studier. Cytoplasmiska lokaliseringer av väletablerade membranmolekyler uteslöts också från flödescytometriska studier. Genom att använda FIX&PERM® har flödescytometriska analyser av intracellulära (cytoplasmiska och nukleära) antigener blivit lika enkelt som ytantigena studier. FIX&PERM® lösningarna kan både användas i automatiserade och icke-automatiserade uppställningar för att studera perifera blodcellsprover, benmärgsprover, mononukleära cellsuspensioner eller cellsuspensioner som preparerats av fast vävnad och *in vitro*-odlade celler.

Denna produkt är endast avsedd att användas för professionell *in vitro*-diagnostik.

Princip

FIX&PERM® innehåller 1 eller 2 lösningar: Fixeringsmedium (lösning A) och/eller permeabiliseringsmedium (lösning B). Avsedd användning är att (först) fixera celler i suspension med lösning A och (sedan) permeabilisera cellmembranen med lösning B. Detta förfarande tillåter inte bara immunfärgningen av cellytans antigener, utan det ger även antikroppar åtkomst till intracellulära strukturer och lämnar cellernas morfologiska spridningsegenskaper intakta. Den specifika formeln minskar bakgrundsfärgningen och möjliggör en samtidig tillsats av permeabiliseringsmedium och fluorokromt märkta antikroppar. FIX&PERM® är lämpligt för analys av normala och maligna leukocytpopulationer som utvunnits ur olika humana biologiska prover (perifera blodcellsprover, benmärgsprover, mononukleära cellsuspensioner eller cellsuspensioner som preparerats av fast vävnad och *in vitro*-odlade celler) med hjälp av flödescytometri. FIX&PERM® lösningar har utformats för att kunna användas med alla kommersiellt tillgängliga flödescytometrar.

INNEHÅLL

Material som tillhandahålls

REF **GAS-002-1-CE/IVD** FIX&PERM® kit 1000 Cellfixerings- och permeabiliseringskit
 Lösning A (fixeringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 4-10 % formaldehyd i fosfatbuffrad

Lösning A
 saltlösning.

1 x 100 ml 1000 tester

Lösning B

Lösning B (permeabiliseringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 0,05 % natriumazid.

1 x 100 ml 1000 tester

REF **GAS-002-CE/IVD** FIX&PERM® Cellfixerings- och permeabiliseringskit

Lösning A (fixeringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 4-10 % formaldehyd i fosfatbuffrad

Lösning A
 saltlösning.

4 x 5 ml 200 tester

Lösning B

Lösning B (permeabiliseringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 0,05 % natriumazid.

4 x 5 ml 200 tester

REF **GAS-002M-CE/IVD** FIX&PERM® provkit Cellfixerings- och permeabiliseringskit

Lösning A (fixeringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 4-10 % formaldehyd i fosfatbuffrad

Lösning A
 saltlösning.

1 x 5 ml 50 tester

Lösning B

Lösning B (permeabiliseringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 0,05 % natriumazid.

1 x 5 ml 50 tester

REF **GAS-002A-1-CE/IVD** FIX&PERM® Lösning A (Fix) Cellfixerings- och permeabiliseringskit

Lösning A (fixeringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 4-10 % formaldehyd i fosfatbuffrad

Lösning A
 saltlösning.

1 x 100 ml 1000 tester

REF **GAS-002B-1-CE/IVD** FIX&PERM® Lösning B (Perm) Cellfixerings- och permeabiliseringskit

Lösning B (permeabiliseringsmedium) skyddad sammanställning, innehåller 0,05 % natriumazid.

Lösning B

1 x 100 ml 1000 tester

Material som krävs, men inte tillhandahålls

Vidta lämpliga skyddsåtgärder, som att bära laboratorierock, handskar, skyddsglasögon etc.

5 ml glas- eller plaströr

Pipetter, vortex och centrifug

Flödescytometer och mantelvätska

Lämpliga (fluorokroma) konjugerade antikroppar

Fosfatbuffrad saltlösning (PBS)

1 % formaldehydlösning (valfritt)

Insamling, lagring och hantering av prover

Biologiska cellprover (perifera blodcellsprover, benmärgsprover, mononukleära cellsuspensioner eller cellsuspensioner som preparerats av fast vävnad och *in vitro*-odlade celler) måste samlas in under sterila förhållanden. Antikoagulering med EDTA eller heparin rekommenderas. Proverna ska lagras i rumstemperatur tills de används. För optimala resultat ska proverna bearbetas och analyseras inom 24 timmar. Prover med ett stort antal icke-viabila celler kan ge falska resultat, och i sådana fall krävs determinering av cellernas viabilitet i ett separat prov med t.ex. propidiumjod utan fixering och permeabilisering med FIX&PERM®. Alla biologiska prover måste hanteras med försiktighet. Betrakta dem alltid som potentiellt infekterade. Vidta lämpliga skyddsåtgärder, som att bära handskar, laboratorierock, etc.

Förfarande för fixering, permeabilisering och färgning

FIX&PERM® lösningarna är färdiga att användas.

- För varje prov som ska analyseras ska 50 µl helblod, benmärgsprov, mononukleär cellsuspension, eller cellsuspension som preparerats av fast vävnad och *in vitro*-odlade celler läggas till i ett 5 ml rör.
- Lägg till 100 µl av lösning A (fixeringsmedium, som lagrats och används vid rumstemperatur)
- Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur
- Lägg till 5 ml fosfatbuffrad saltlösning och centrifugera cellerna i 5 minuter vid 300xg
- Avlägsna supernatant och lägg till 100 µl lösning B (permeabiliseringsmedium) och 20 µl av det lämpliga antikroppskonjugatet till cellpelleten
- Vortexbehandla vid låg hastighet i 1-2 sekunder
- Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur
- Tvätta cellerna med fosfatbuffrad saltlösning på det sätt som beskrivs ovan
- Avlägsna supernatant och resuspendera cellerna i mantelvätska för omedelbar analys eller resuspendera cellerna i 0,5 ml 1,0 % formaldehyd och lagra dem vid 2-8°C i mörker. Analysera fixerade celler inom 24 timmar.

Kommentarer: Specialfall (utspädda benmärgsprover, andra prover som innehåller låglösligt protein) kan främjas av påfyllning med plasmakomponenter före behandlingen med FIX&PERM® för att skapa en miljö, som mer liknar situationen i antikoagulerat blod. I det syftet rekommenderas tillsats av IgG-preparat (t.ex. Beriglobulin P, ZLB Behring, slutlig koncentration 10 mg/ml) och humant serumalbumin (t.ex. humant albumin "Behring" 20% - infusionslösning, slutlig koncentration 40 mg/ml).

Prestandaegenskaper

FIX&PERM® har i ett antal publikationer (se utvalda referenser nedan) visat sig möjliggöra en framgångsrik immunfärgning av cellens ytmarkörer och intracellulära antigener i olika slags celler som utvunnits ur perifert blod eller benmärg samtidigt som spridningskännetecknen för dessa celltyper förblev intakta. Genom detta kan de olika celltyperna och deras mognadsstadier kvantifieras med flödescytometriteknik i normalt och (pre)malignt blod och benmärgsprover. För illustrationer av representativa prestandaegenskaper hänvisas till exemplen nedan. Prestationerna för varje FIX&PERM®-sats avgörs genom fixering och permeabilisering av väldefinierade blodprover från representativa givare och en följande jämförelse av fram- och sidospredda kännetecknen från leukocyter som erhållits, samt genom immunfärgningseffektiviteten för flera membrana och cytoplastiska antigener. Avvikelser från dessa 7 parametrar som har fastställts mellan följande sats är mindre än 10 %.

Teknikens begränsningar

Genom att använda FIX&PERM® har flödescytometriska analyser av intracellulära antigener blivit lika enkelt som ytantigena studier. Det enda villkoret är att det finns lämpliga antikropps-konjugat. De flesta av de tillgängliga (monoklona) antikropps-konjugaten kan användas med FIX&PERM®, vissa determinanter är dock känsliga mot det fixeringssteg som ingår. Detta och den optimala fixeringstiden måste testas för varje lösning. Vissa färgningsexempel med antikropps-konjugat visas nedan.

FIX&PERM® lösningar har utformats för att kunna användas med alla kommersiellt tillgängliga flödescytometrar. Utjämning och kompensation ska utföras i enlighet med tillverkarens instruktioner. Flödescytometri ska endast utföras av professionella användare. Felaktig inställning av flödescytometern, bristfällig kompensation för fluorescens som läcker till andra kanaler samt en felaktig positionering av regionerna kan leda till falska resultat. Lysering av röda blodkroppar kan vara omöjligt av olika skäl. I sådana fall rekommenderar vi att ni isolerar mononukleära celler (MNC) via densitetsgradientcentrifugering före färgningen. Resultaten blir korrekta och reproducerbara om de förfaranden som används respekterar de tekniska rekommendationerna och följer god laboratoriepraxis. FIX&PERM® lösningarna tillhandahålls i en koncentration som gör det möjligt att fixera och permeabilisera humana hematopoetiska celler. Vi rekommenderar därför att man verkligen håller sig till protokollet vad gäller koncentrationen och volymerna för celler och antikroppar. Egenskaperna för FIX&PERM® har fastställts med EDTA antikoagulerat perifert blod och benmärgsprover.

Varningar och försiktighetsåtgärder

Endast för professionella användare.

Lösning A i FIX&PERM® innehåller formaldehyd och är märkt: Skadligt. Formaldehyd är toxiskt, allergiframkallande och misstänkt cancerframkallande. Pipettera aldrig med munnen och undvik kontakt med ögon, hud och kläder. Lämpliga hanteringsförfaranden rekommenderas. Som huvudregel får inte personer under 18 år arbeta med denna produkt. Användarna måste få noggranna instruktioner om de rätta arbetsätten, om produktens farliga egenskaper och om nödvändiga säkerhetsinstruktioner. I säkerhetsdatabladet finns mer information. Kassera produktrester i enlighet med lokala regler.

Alla allvarliga incidenter som inträffar i samband med enheten ska rapporteras till tillverkaren och till den behöriga myndigheten i den EU-medlemsstat där användaren och/eller patienten har sitt säte.

Endast för lösning A: det farliga ämnet innehåller 4-10 % formaldehyd



Fara
H341: Misstänks kunna orsaka genetiska defekter (ange exponeringsväg om det är definitivt bevisat att faran inte kan orsakas av några andra exponeringsvägar)

H350: Kan orsaka cancer (ange exponeringsväg om det är definitivt bevisat att faran inte kan orsakas av några andra exponeringsvägar)

H317: Kan orsaka allergisk hudreaktion

P201: Inhämta särskilda instruktioner före användning.

P280: Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

P308+P313: Vid exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.

P333+P313: Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.

P362+P364: Nedstänkta kläder tas av och tvättas innan de används igen.

Lagring

FIX&PERM® lösningar ska lagras och användas vid rumstemperatur (18-24°C). Fry inte in. Lösningens stabilitet: Se det bäst före-datum som finns tryckt på ampullen. Vi avråder från att använda lösningen efter bäst före-datumet. Om lösningarna lagrats under andra förhållanden än de angivna, måste förhållandena verifieras av användaren. Använd inte lösningarna om fällningar eller missfärgningar uppträder.

Lagringsförhållandena efter att ampullerna har öppnats är desamma som för oöppnade ampuller.

Om oväntade resultat erhålls, som inte beror på skillnader i laboratoriets förfaranden ber vi er att kontakta oss.

Garanti

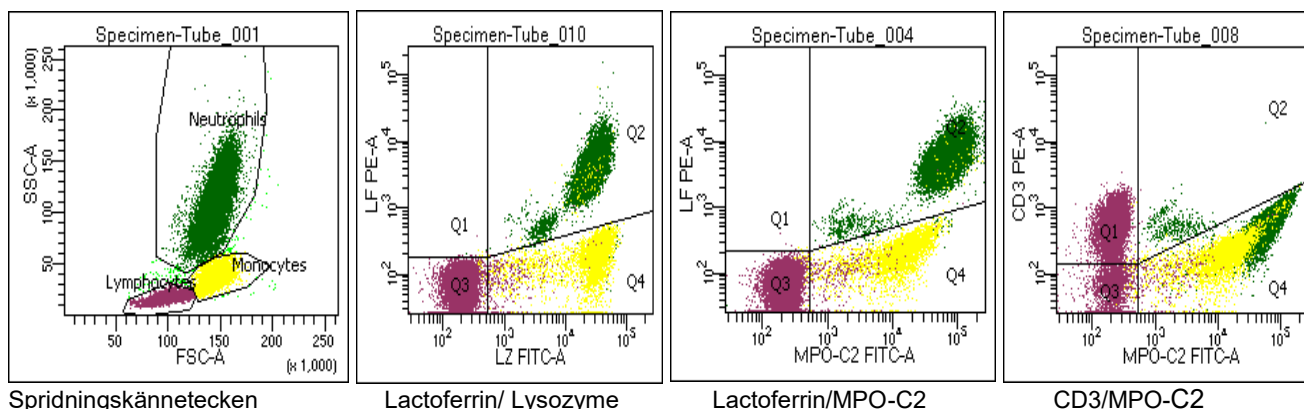
De produkter som säljs omfattas bara av en garanti som gäller den kvantitet och det innehåll som anges på etiketten vid tidpunkten för leverans till kunden. Inga garantier ges, varken uttryckliga eller underförstådda, som går längre än beskrivningen på produktetiketten. Nordic-MUBios enda ansvar begränsas till att antingen ersätta produkterna eller betala tillbaka köpesumman. Nordic-MUBio är inte ansvarigt för skadad egendom, personskador eller ekonomiska förluster som har förorsakats av produkten.

Utvalda referenser

- 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., Karasz, 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

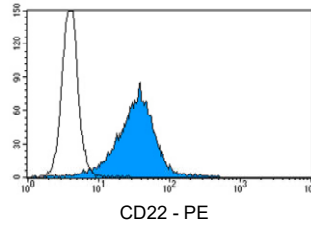
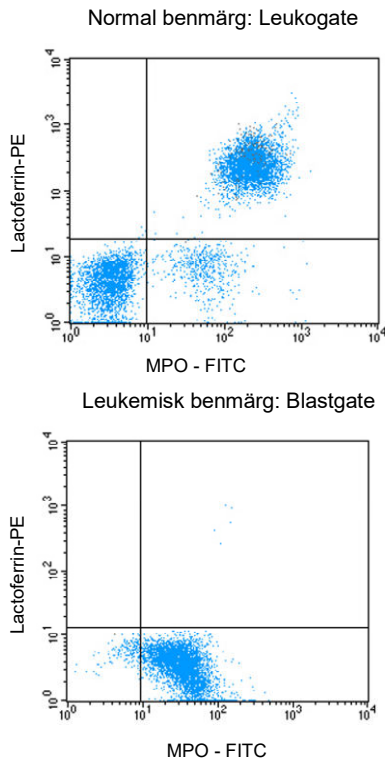
Representativa exempel

Testade prover: helblod (EDTA), behandlat med FIX&PERM[®] cellfixerings- och permeabiliseringskit och immunmärkt för ytmarkör CD3, och de cytoplasmiska antigenerna Lactoferrin (LF), Lysozyme (LZ) och Myeloperoxidase (MPO-C2).

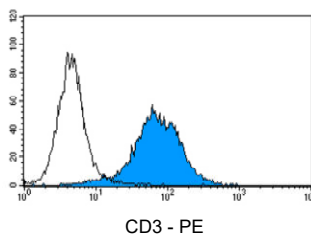


Resultat: Intracellulära och membrana märkningsmönster av god kvalitet med både PE- och FITC-konjugerade monoklonala antikroppar. Spridningskännetecknen möjliggör en god separation av leukocyt-underpopulationer.

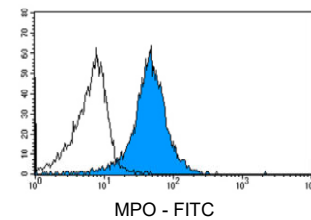
Testade prover: benmärgsprover från ett icke-malignt fall (normal BM), och från flera leukemipatienter (leukemisk BM, B-ALL, T-ALL och AML) behandlade med FIX&PERM[®] permeabiliseringskit och immunmärkt för ytmarkörerna CD3 och CD22, och de cytoplasmiska antigenerna Lactoferrin och Myeloperoxidase (MPO).



Cytoplasmisk märkning med CD22-PE-konjugat av odifferentierade leukemiceller av typen B-ALL.



Cytoplasmisk märkning med CD3-PE-konjugat av yt-CD3-negativa odifferentierade leukemiceller av typen T-ALL.



Cytoplasmisk märkning med MPO-FITC-konjugat av odifferentierade leukemiceller av typen AML.

Resultat: Intracellulära och membrana märkningsmönster av god kvalitet med både PE- och FITC-konjugerade monoklonala antikroppar som möjliggör differentialdiagnos av de olika typerna och faserna av leukemi.

Utfärdat den

Version 2: 22 maj 2022

Ändringar som införts: Denna version har ändrats så att den efterlever IVD-R