


Istruzioni per l'uso FIX&PERM®

Per colorazioni di sospensioni e analisi citofluorimetriche di membrane di superficie e antigeni intracellulari.

REF GAS-002-1-CE/IVD FIX&PERM® Kit 1000 Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare			
Soluzione A (Mezzo di fissazione)	1 x 100 ml	1000 Test	
Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione)	1 x 100 ml	1000 Test	

REF GAS-002-CE/IVD FIX&PERM® Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare		
Soluzione A (Mezzo di fissazione)	4 x 5 ml	200 Test
Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione)	4 x 5 ml	200 Test

REF GAS-002M-CE/IVD FIX&PERM® Kit di campioni Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare		
Soluzione A (Mezzo di fissazione)	1 x 5 ml	50 Test
Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione)	1 x 5 ml	50 Test

REF GAS-002A-1-CE/IVD FIX&PERM® Soluzione A (fissazione) Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare		
Soluzione A (Mezzo di fissazione)	1 x 100 ml	1000 Test

REF GAS-002B-1-CE/IVD FIX&PERM® Soluzione B (permeabilizzazione) Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare		
Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione)	1 x 100 ml	1000 Test

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

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

Destinazione d'uso

Il dispositivo si intende destinato alla preparazione di campioni di sospensione cellulare per analisi citofluorimetriche. Tali analisi con anticorpi (monoclonali) sono state per lungo tempo destinate solamente alle molecole di superficie cellulare. Le strutture intracellulari come gli enzimi citoplasmatici o nucleari, le oncoproteine, le citochine, le immunoglobuline ecc. erano in gran parte escluse da tali esami. Inoltre, erano escluse le localizzazioni citoplasmatiche di molecole di membrana ben stabilizzate. Grazie a FIX&PERM®, l'analisi citofluorimetrica degli antigeni intracellulari (citoplasmatici e nucleari) è diventata facile proprio come gli studi sugli antigeni di superficie. Le soluzioni FIX&PERM® possono essere utilizzate con strumenti di analisi automatizzati e non automatizzati per studiare campioni di cellule ematiche periferiche, aspirati midollari, sospensioni di cellule mononucleate o sospensioni cellulari preparate da tessuti solidi o da cellule coltivate in vitro.

Questo prodotto si intende destinato solamente a un uso diagnostico *in vitro* da parte di personale specializzato.

Principio

FIX&PERM® contiene 1 o 2 soluzioni: Mezzo di fissazione (Soluzione A) e/o Mezzo di permeabilizzazione (Soluzione B). Il prodotto è destinato a essere impiegato per la fissazione di cellule in sospensione con la soluzione A e successivamente per la permeabilizzazione delle membrane cellulari con la soluzione B. Questa procedura non solo porta alla immunocolorazione degli antigeni di superficie cellulare, ma apre inoltre la strada per gli anticorpi alle strutture intracellulari, lasciando intatte le caratteristiche di scatter della cellula. La particolare formulazione riduce la colorazione di fondo, contemporaneamente permettendo l'aggiunta del mezzo di permeabilizzazione e degli anticorpi marcati con fluorocromo. FIX&PERM® è idoneo all'analisi di popolazioni leucocitarie normali e maligne prelevate da vari campioni biologici umani (campioni di cellule ematiche periferiche, aspirati midollari, sospensioni di cellule mononucleate o sospensioni cellulari preparate da tessuti solidi e da cellule coltivate in vitro) da svolgersi tramite tecniche citofluorimetriche. Le soluzioni FIX&PERM® sono adatte all'uso in tutti i citometri a flusso disponibili sul mercato.

CONTENUT **Materiali forniti**

REF GAS-002-1-CE/IVD FIX&PERM® Kit 1000 Kit di fissazione e permeabilizzazione cellulare	
Soluzione	Soluzione A (Mezzo di fissazione) composizione riservata, contiene 4-10% formaldeide in tampone fosfato salino. 1 x 100 ml 1000 Test
Soluzione	Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione) composizione riservata, contiene 0,05% azoturo di sodio.

1 x 100 ml 1000 Test

REF **GAS-002-CE/IVD FIX&PERM®** Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare

Soluzione	Soluzione A (Mezzo di fissazione) composizione riservata, contiene 4-10% formaldeide in tampone fosfato salino. 4 x 5 ml ml	200 Test
-----------	--	----------

Soluzione	Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione) composizione riservata, contiene 0,05% azoturo di sodio. 4 x 5 ml ml	200 Test
-----------	---	----------

REF **GAS-002M-CE/IVD FIX&PERM®** Kit di campioni Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare

Soluzione	Soluzione A (Mezzo di fissazione) composizione riservata, contiene 4-10% formaldeide in tampone fosfato salino. 1 x 5 ml	50 Test
-----------	---	---------

Soluzione	Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione) composizione riservata, contiene 0,05% azoturo di sodio. 1 x 5 ml	50 Test
-----------	--	---------

REF **GAS-002A-1-CE/IVD FIX&PERM®** Soluzione A (fissazione) Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare

Soluzione	Soluzione A (Mezzo di fissazione) composizione riservata, contiene 4-10% formaldeide in tampone fosfato salino. 1 x 100 ml	1000 Test
-----------	---	-----------

REF **GAS-002B-1-CE/IVD FIX&PERM®** Soluzione B (permeabilizzazione) Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare

Soluzione	Soluzione B (Mezzo di permeabilizzazione) composizione riservata, contiene 0,05% azoturo di sodio. 1 x 100 ml	1000 Test
-----------	--	-----------

Materiali necessari ma non forniti

Utilizzare adeguate precauzioni di sicurezza come il camice da laboratorio, i guanti, gli occhiali protettivi ecc.

Provette in vetro o plastica da 5 ml

Pipette, vortex e centrifuga

Citometro a flusso e fluido di scorrimento

Anticorpi adeguatamente coniugati (fluorocromo)

Tampone fosfato salino (PBS)

Soluzione di formaldeide 1% (opzionale)

Raccolta campioni, stoccaggio e manipolazione

I campioni di cellule biologiche (campioni di cellule ematiche periferiche, aspirati midollari, sospensioni di cellule mononucleate o sospensioni cellulari preparate da tessuto solido o da cellule coltivate *in vitro*) devono essere raccolti in condizioni sterili. È raccomandato l'utilizzo di anticoagulanti (EDTA o eparina). I campioni devono essere stoccati a temperatura ambiente prima dell'uso. Per risultati ottimali, i campioni devono essere processati e analizzati entro 24 ore. I campioni con un alto numero di cellule non vitali potrebbero causare risultati falsati. In tal caso, è richiesta una valutazione della vitalità cellulare in un campione separato con, per esempio, ioduro di propidio, senza fissazione e permeabilizzazione con FIX&PERM®. Tutti i campioni biologici devono essere maneggiati con cautela. Ogni campione biologico è sempre da considerarsi potenzialmente infetto. Utilizzare precauzioni adeguate come guanti, camice da laboratorio, ecc.

Procedura di fissazione, permeabilizzazione e colorazione

Le soluzioni FIX&PERM® sono pronte all'uso.

- Per ogni campione da analizzare, aggiungere 50 µl di sangue intero, aspirato midollare, sospensione di cellule mononucleate o sospensioni cellulari preparate da tessuto solido o con cellule coltivate *in vitro* in una provetta da 5 ml.
- Aggiungere 100 µl di soluzione A (mezzo di fissazione, stoccato e utilizzato a temperatura ambiente)
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente
- Aggiungere 5 ml di tampone fosfato salino e centrifugare le cellule per almeno 5 minuti a 300xg
- Rimuovere il surnatante e aggiungere al precipitato cellulare 100 µl di soluzione B (mezzo di permeabilizzazione) e 20 µl di un idoneo coniugato anticorpale
- Agitare nel vortex a velocità bassa per 1-2 secondi
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente
- Lavare le cellule con tampone fosfato salino come indicato sopra
- Rimuovere il surnatante e risospendere le cellule nel fluido di scorrimento per un'analisi immediata, oppure risospendere le cellule in 0,5 ml di formaldeide 1,0% e stoccare a 2-8°C al buio. Analizzare le cellule fissate entro 24 ore.

Commenti: In alcuni casi specifici (campioni di midollo osseo diluiti, altri campioni con proteine a bassa solubilità) potrebbe essere utile aggiungere componenti plasmatici prima di effettuare il trattamento con FIX&PERM® per creare un ambiente più simile al sangue anticoagulato. A tal fine, si raccomanda di aggiungere preparazioni di immunoglobuline (ad es. Beriglobulin P, ZLB Behring, concentrazione finale 10 mg/ml) e albumina sierica umana (p.es. albumina umana "Behring" 20 - soluzione per infusione, concentrazione finale 40 mg/ml).

Prestazioni

È stato dimostrato in molte pubblicazioni (si veda la bibliografia scelta) che FIX&PERM® permette una corretta immunocolorazione dei marcatori di superficie cellulare e degli antigeni intracellulari in diversi tipi di cellule provenienti da sangue periferico o midollo osseo, lasciando intatte allo stesso tempo le caratteristiche di scatter delle cellule. Di conseguenza, è

possibile quantificare i diversi tipi di cellule nei loro stadi di maturazione con tecniche citofluorimetriche in sangue e aspirati midollari normali o (pre)maligni. Per un'illustrazione delle caratteristiche di prestazioni rappresentative, si vedano gli esempi qui sotto. Le prestazioni di ogni lotto di FIX&PERM® sono determinate dalla fissazione e permeabilizzazione di campioni di sangue ben definiti di donatori rappresentativi, con successivo paragone delle caratteristiche di forward e side scatter dei leucociti ottenuti, così come l'efficienza di immunocolorazione per diversi antigeni della membrana e del citoplasma. Le deviazioni rilevate tra lotti diversi per i sette parametri stabiliti sono tutte al di sotto del 10%.

Limitazioni tecniche

Grazie a FIX&PERM®, l'analisi citofluorimetrica degli antigeni intracellulari è diventata facile come gli studi sugli antigeni di superficie. L'unico prerequisito è la disponibilità di coniugati anticorpali adeguati. La maggior parte dei coniugati anticorpali (monoclonali) disponibili può essere utilizzata con FIX&PERM®. Tuttavia, alcuni determinanti sono sensibili alla fase di fissazione inclusa nel processo. Tale sensibilità e i tempi di fissazione ottimali devono essere testati per ogni soluzione. Di seguito sono riportati alcuni esempi di colorazione con coniugati anticorpali.

Le soluzioni FIX&PERM® sono adatte all'uso in tutti i citometri a flusso disponibili sul mercato. L'allineamento e la compensazione devono essere eseguiti secondo le istruzioni del produttore. La citofluorimetria deve essere eseguita solamente da personale qualificato. Un allineamento scorretto del citometro a flusso, una compensazione inadeguata della fluorescenza che invada altri canali così come un posizionamento errato delle regioni di interesse potrebbero produrre risultati falsati. La lisi degli eritrociti potrebbe risultare impossibile per diversi motivi. In tal caso, si consiglia di isolare le cellule mononucleate (MNC) per centrifugazione in gradiente di densità prima della colorazione. I risultati ottenuti saranno corretti e riproducibili a condizione che nelle procedure utilizzate si rispettino le raccomandazioni tecniche e le buone pratiche di laboratorio. Le soluzioni FIX&PERM® sono fornite a una concentrazione che permette di fissare e permeabilizzare le cellule ematopoietiche umane. Si raccomanda vivamente, pertanto, di rispettare i protocolli di lavoro su concentrazioni e volumi relativi a cellule e anticorpi. Le proprietà di FIX&PERM® sono state determinate utilizzando sangue periferico e aspirati midollari anticoagulati con EDTA.

Avvertenze e precauzioni

Solo per personale qualificato.

La soluzione A di FIX&PERM® contiene formaldeide e prevede la seguente etichetta: Nocivo. La formaldeide è tossica, allergenica e sospetta cancerogena. Non tenere mai la pipetta con la bocca e evitare contatto con occhi, pelle e indumenti. Si raccomanda di utilizzare adeguate procedure di manipolazione. Come regola generale, i minori di 18 anni non sono autorizzati a lavorare con questo prodotto. Gli utilizzatori devono ricevere istruzioni accurate sulle procedure di lavoro adeguate, le proprietà pericolose del prodotto e le necessarie indicazioni di sicurezza. Per ulteriori informazioni, consultare la Scheda di Dati di Sicurezza (SDS). Smaltire i resti di prodotto secondo le normative locali.

Qualsiasi incidente serio che si verifichi con il dispositivo dovrà essere segnalato al produttore e alla competente autorità dello Stato Membro UE in cui l'utilizzatore e/o il paziente sono stabiliti.

Solo per soluzione A: sostanza pericolosa contenuto 4-10% formaldeide



Pericolo

H341: Sospettato di provocare alterazioni genetiche (indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo)

H350: Può provocare il cancro (indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo)

H317: Può provocare una reazione allergica della pelle

P201: Procurarsi le istruzioni prima dell'uso.

P280: Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso.

P308+P313: In caso di esposizione o possibile esposizione: Consultare un medico,

P333+P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico,

P362+P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Stoccaggio

Le soluzioni FIX&PERM® devono essere stoccate e utilizzate a temperatura ambiente (18-24°C). Non congelare. Stabilità della soluzione: Consultare la data di scadenza stampata sulla fiala. Si sconsiglia l'uso della soluzione dopo la data di scadenza. Se le soluzioni sono stoccate a condizioni diverse da quelle specificate, l'utilizzatore dovrà verificare tali condizioni. Non utilizzare le soluzioni se si forma un precipitato o si verifica uno scolorimento.

Le condizioni di stoccaggio dopo l'apertura delle fiale sono le stesse che delle fiale non aperte.

Se si ottengono risultati inaspettati che non possono essere attribuite a procedure di laboratorio diverse, si prega di contattarci.

Garanzia

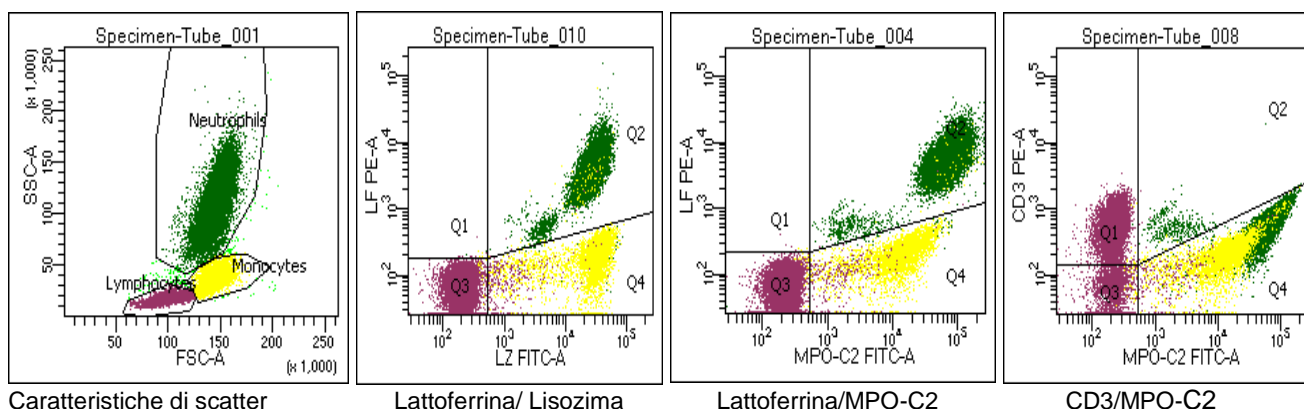
I prodotti venduti secondo il presente documento sono garantiti solamente per la quantità e i contenuti dichiarati sull'etichetta al momento della consegna al cliente. Non si fornisce alcuna garanzia, espressa o implicita, che si estenda oltre quanto espressamente indicato nella descrizione sull'etichetta del prodotto. La sola responsabilità di Nordic-MUbio è limitata alla sostituzione dei prodotti o il rimborso del prezzo di acquisto. Nordic-MUbio non è responsabile per danni materiali, lesioni personali o perdite economiche causate dal prodotto.

Bibliografia scelta

- 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., 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) 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

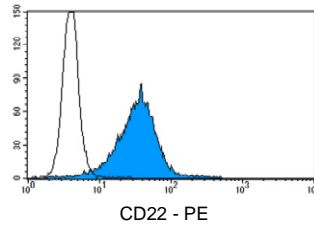
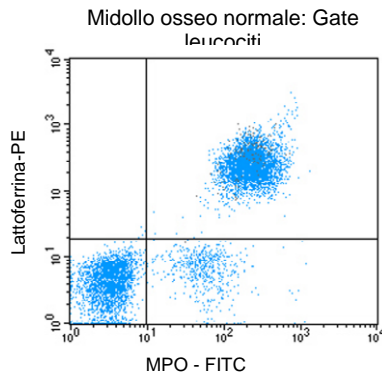
Esempi rappresentativi

Campioni testati: sangue intero (EDTA), trattato con FIX&PERM® Kit per fissazione e permeabilizzazione cellulare e immunocolorato per il marcatore di superficie CD3 e gli antigeni citoplasmatici lattoferrina (LF), lisozima (LZ) e mieloperossidasi (MPO-C2)

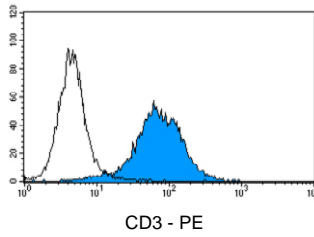
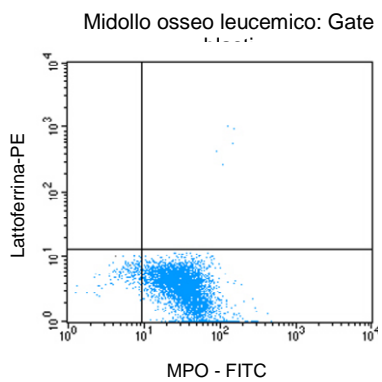


Risultato: Buona qualità intracellulare e pattern di colorazione di membrana con anticorpi monoclonali coniugati sia con PE che con FITC. Le caratteristiche di scatter ottenute permettono una buona separazione delle sottopopolazioni leucocitarie.

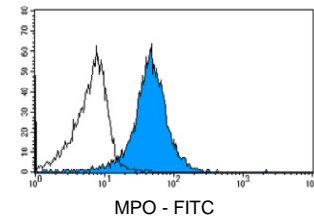
Campioni testati: aspirati midollari provenienti da un caso benigno (midollo osseo normale) e da diversi pazienti leucemici (midollo leucemico, B-LLA, T-LLA e AML) trattati con FIX&PERM® Kit per fissazione e permeabilizzazione e immunocolorati per i marcatori di superficie CD3 e CD22 e gli antigeni citoplasmatici lattoferrina e mieloperossidasi (MPO).



Colorazione citoplasmatica con coniugato CD22-PE di cellule leucemiche indifferenziate del tipo B-LLA.



Colorazione citoplasmatica con coniugato CD3-PE di cellule leucemiche indifferenziate negative con CD3 in superficie del tipo T-LLA.



Colorazione citoplasmatica con coniugato anti MPO- FITC di cellule leucemiche indifferenziate del tipo AML.

Risultato: Buona qualità intracellulare e pattern di colorazione di membrana con anticorpi monoclonali coniugati sia con PE che con FITC che permette una diagnosi differenziale di diversi tipi e fasi di leucemia.

Data di rilascio

Versione: 22 maggio 2022

Modifiche introdotte: Questa versione è stata modificata per essere conforme all'IVD-R.