

ORDIN DE PLATA NR.323

Tip.doc. 1

DATA EMITERII: 03 septembrie 2021

PLATITI:52640-00

LEI: Cincizeci si Doua Mii Sase Sute Pa:
truzeci, 00

PLATITOR: (R)MEDIST GRUP SRL

CODUL IBAN:MD57VI02224260000269MDL:
CODUL FISCAL:1018600004516

PRESTATORUL PLATITOR

B.C VictoriaBank S.A. s.26 Chisinau

BENEFICIAR: (R) CENTRUL PENTRU ACHIZITII P CODUL IBAN:MD23TRPCCC518430B01859AA:
UBLICE CENTRALIZATE IN SANATATE CODUL FISCAL:1016601000212

PRESTATORUL BENEFICIAR

Min.Finantelor-Trezoreria de Stat

DESTINATIA PLATII: /P102/52640,00 Garantia in valo :
arede 2 procente, pentru oferta la licitatie deschi: NORMAL/URGENT:NO
sa ID licitatie 21042696 si ID MTender ocds-b3wdp1-:
MD-1627997360466

L.S.

CODUL TRANZACTIEI:101

DATA PRIMIRII:

DATA EXECUTARII:

SEMNATURILE
EMITENTULUI

SEMNATURA PRESTATORULUI

MOTIVUL REFUZULUI



08:51:58 08 SEP 2021

Semnatura electronica:

JhEaB5NHEOIFDXaYKpHXWdc37grSj+50Fk6D6hXexoHBaWBtSJ/rlvsxHYMkZ9QkLlmb4Fm5fegZ
GoV3PxOvaSza+mzyl2137/47wLpccjexS7m+ZhgW7KJ1WdtVGTlgcVLNw7V501/7EErmwv8Oqvd
68OFS1Lzy7P7rVgmJwHp9QDK0rMfQw2mCCB4j+6aMj/Q2RbEolMqY1ZoWZZMYKqXYpAsSVS90h+
xBupL+JDeJ091qc+vP6ily72vDQEpADdhOu+8vWgbQBRxKTVDobxibNIwbnj9PS07ox5f4gAvb0Y
fQQNHv410me85wA/H+Jp4gDsXuS/PxPUNUvSQw==

CERTIFICAT
privind lipsa sau existența restanțelor față de bugetul public național

Nr. **A2114985**
№

din **06.09.2021**
ot

1. Destinația / Назначение

pentru participare la proceduri de achizitii publice

2. Date despre contribuabil / Информация о налогоплательщике

Denumirea Наименование	Codul fiscal / Numărul de identificare Фискальный код / Идентификационный номер
MEDIST GRUP S.R.L.	1018600004516
Adresa sediului de bază (strada, numărul) Адрес основного месторасположения (улица, номер)	Codul - Denumirea localității Код - Наименование населенного пункта
Mitropolit Gavriil Banulescu-Bodoni nr.25 of.33	0120-SEC.BUIUCANI

3. Atestarea lipsei sau existenței restanțelor conform datelor Sistemului Informațional Automatizat /

Подтверждение отсутствия или наличия недоимки согласно данных Информационной автоматизированной системы

La data emiterii prezentului certificat restanța față de bugetul public național constituie/ На дату выдачи данной справки недоимка перед национальным публичным бюджетом составляет:
0,00 lei/лей.

4. Valabil pînă la / Действителен до 21.09.2021

5. Autentificarea Serviciului Fiscal de Stat / Подтверждение Государственной налоговой службы

Șef al DDF Buiucani
din cadrul DGAF mun.Chișinău



Monică
Semnătura/Подпись

Anastasia MOVILĂ
Numele și prenumele/Фамилия и имя

Este extras din Sistemul Informațional al SFS SIA „Contul curent al contribuabilului”// 06.09.2021 ora 9:04:48
cu aplicarea prevederilor pct. 82-83 Ordin IFPS nr.400 din 14.03.2014 (Monitorul Oficial 72-77/399, 28.03.2014)

NOTA (0,00)



I.P. "AGENȚIA SERVICII PUBLICE"

Departamentul înregistrare și licențiere a unităților de drept

EXTRAS din Registrul de stat al persoanelor juridice

nr. 11186 din 07.06.2021

Denumirea completă: **Societatea cu Răspundere Limitată «MEDIST GRUP».**

Denumirea prescurtată: **«MEDIST GRUP» S.R.L.**

Forma juridică de organizare: **Societate cu Răspundere Limitată.**

Numărul de identificare de stat și codul fiscal: **1018600004516.**

Data înregistrării de stat: **02.02.2018.**

Sediul: **MD-2012, str. Mitropolit Gavriil Bănulescu-Bodoni, 25, of. 33, mun.Chișinău, Republica Moldova.**

Modul de constituire: **nou creată.**

Obiectul principal de activitate:

- 1 Comerț cu ridicata al produselor farmaceutice;**
- 2 Comerț cu ridicata nespecializat;**
- 3 Repararea echipamentelor electronice și optice;**
- 4 Activități de testare și analize tehnice;**
- 5 Comerț cu amănuntul al articolelor medicale și ortopedice, în magazine specializate.**

Capitalul social: **373026 lei.**

Administrator: **ANGHEL GABRIELA-CRISTINA.**

Asociați:

- 1. «MEDIST IMAGING & P.O.C.» S.R.L., ROMÂNIA 33,00 %**
- 2. «MEDIST LIFE SCIENCE» S.R.L., ROMÂNIA 33,00 %**
- 3. «MEDIST» S.R.L., ROMÂNIA 34,00 %.**

Prezentul extras este eliberat în temeiul art. 34 al Legii nr. 220-XVI din 19 octombrie 2007 privind înregistrarea de stat a persoanelor juridice și a întreprinzătorilor individuali și confirmă datele din Registrul de stat la data de: 07.06.2021.

Specialist coordonator
tel. 022-207-838



Gutu Victoria



EB 0365528



VICTORIABANK
PRIMA BANCĂ DIN MOLDOVA



Filiala nr. 26 Chișinău
str. Mt. Bănulescu-Bodoni, 28/1
MD-2005, mun. Chișinău
Tel.: (+373 22) 92-92-52
Fax: (+373 22) 78-47-30
SWIFT: VICBMD2X469
IDNO 1002600001338
Capital social – 250 000 910 lei
www.victoriabank.md

Nr. 261466 din " 19 " ianie 2018

La Nr. 395 din " 19 " ianie 2018

Secret bancar
Confidențial

CERTIFICAT

Prin prezentul, BC "VICTORIABANK" SA Sucursala nr.26 Chișinău, codul băncii VICBMD2X469, cod fiscal 1002600001338, confirmă că MEDIST GRUP SRL, cod fiscal 1018600004516, deține următoarele conturi curente în format IBAN:

MD57VI022242600000269MDL;

MD76VI022242600000105USD;

MD61VI022242600000116EUR;

MD83VI022242600000008RON.

Certificatul este eliberat la cererea clientului pentru a fi prezentat la destinație.

Cebanu Valentina
Director



Blanovscaia Anna
Contabil-șef

Ex: Scutaru Lilia
tel. 022 78-47-32

VICTORIABANK

SITUAȚIILE FINANCIARE

pentru perioada 01.01.2020 - 31.12.2020

Entitatea: MEDIST GRUP S.R.L.**Cod CUIŢO:** 41247072**Cod IDNO:** 1018600004516

Sediul:

MD: 2008**Raionul(municipiul):** 105, DDF BUIUCANI**Cod CUATM:** 0120, SEC.BUIUCANI**Strada:** Mitropolit Gavriil Banulescu-Bodoni nr.25 of.33**Activitatea principală:** G4646, Comert cu ridicata al produselor farmaceutice**Forma de proprietate:** 15, Proprietatea privată**Forma organizatorico-juridică:** 530, Societăți cu răspundere limitată

Date de contact:

Telefon: 068681147**WEB:****E-mail:** natalia.mutu@medist.md**Numele și coordonatele al contabilului-șef:** DI (dna) Mutu Natalia Tel. 068681147**Numărul mediu al salariaților în perioada de gestiune:** 6 persoane.**Persoanele responsabile de semnarea situațiilor financiare*** Anghel Gabriela-Cristina

Unitatea de măsură: leu

BILANȚULla 31.12.2020

Anexa 1

Nr. cpt.	Indicatori	Cod rd.	Sold la	
			Începutul perioadei de gestiune	Sfârșitul perioadei de gestiune
1	2	3	4	5
	A C T I V			
	ACTIVE IMOBILIZATE			
	I. Imobilizări necorporale			
	1. Imobilizări necorporale în curs de execuție	010		
	2. Imobilizări necorporale în exploatare, total	020	11000	1927
	din care:			
	2.1. concesiuni, licențe și mărci	021		
	2.2. drepturi de autor și titluri de protecție	022		
	2.3. programe informatice	023	11000	1927
	2.4. alte imobilizări necorporale	024		
	3. Fond comercial	030		
	4. Avansuri acordate pentru imobilizări necorporale	040		
	Total imobilizări necorporale (rd.010 + rd.020 + rd.030 + rd.040)	050	11000	1927
	II. Imobilizări corporale			
	1. Imobilizări corporale în curs de execuție	060		
	2. Terenuri	070		
	3. Mijloace fixe, total	080	236444	1112754
	din care:			
	3.1. clădiri	081		
	3.2. construcții speciale	082		
	3.3. mașini, utilaje și instalații tehnice	083	230287	1103416
	3.4. mijloace de transport	084		

A.

3.5. inventar și mobilier	085		
3.6. alte mijloace fixe	086	6157	9338
4. Resurse minerale	090		
5. Active biologice imobilizate	100		
6. Investiții imobiliare	110		
7. Avansuri acordate pentru imobilizări corporale	120		35992
Total imobilizări corporale (rd.060 + rd.070 + rd.080 + rd.090 + rd.100 + rd.110 + rd.120)	130	236444	1148746
III. Investiții financiare pe termen lung			
1. Investiții financiare pe termen lung în părți neafiliate	140		
2. Investiții financiare pe termen lung în părți afiliate, total	150		
din care:			
2.1. acțiuni și cote de participație deținute în părțile afiliate	151		
2.2 împrumuturi acordate părților afiliate	152		
2.3 împrumuturi acordate aferente intereselor de participare	153		
2.4 alte investiții financiare	154		
Total investiții financiare pe termen lung (rd.140 + rd.150)	160		
IV. Creanțe pe termen lung și alte active imobilizate			
1. Creanțe comerciale pe termen lung	170		
2. Creanțe ale părților afiliate pe termen lung	180		
inclusiv: creanțe aferente intereselor de participare	181		
3. Alte creanțe pe termen lung	190		
4. Cheltuieli anticipate pe termen lung	200		
5. Alte active imobilizate	210		
Total creanțe pe termen lung și alte active imobilizate (rd.170 + rd.180 + rd.190 + rd.200 + rd.210)	220		
TOTAL ACTIVE IMOBILIZATE (rd.050 + rd.130 + rd.160 + rd.220)	230	247444	1150673

B.

ACTIVE CIRCULANTE			
I. Stocuri			
1. Materiale și obiecte de mică valoare și scurtă durată	240	47176	42145
2. Active biologice circulante	250		
3. Producția în curs de execuție	260		
4. Produse și mărfuri	270	197174	1838458
5. Avansuri acordate pentru stocuri	280		
Total stocuri (rd.240 + rd.250 + rd.260 + rd.270 + rd.280)	290	244350	1880603
II. Creanțe curente și alte active circulante			
1. Creanțe comerciale curente	300	270202	943191
2. Creanțe ale părților afiliate curente	310		
inclusiv: creanțe aferente intereselor de participare	311		
3. Creanțe ale bugetului	320	74896	266004
4. Creanțele ale personalului	330	2950	
5. Alte creanțe curente	340	224026	701053
6. Cheltuieli anticipate curente	350	32706	44875
7. Alte active circulante	360	12381	13806
Total creanțe curente și alte active circulante (rd.300 + rd.310 + rd.320 + rd.330 + rd.340 + rd.350 + rd.360)	370	617161	1968929
III. Investiții financiare curente			
1. Investiții financiare curente în părți neafiliate	380		
2. Investiții financiare curente în părți afiliate, total	390		
din care:			
2.1. acțiuni și cote de participație deținute în părțile afiliate	391		
2.2. împrumuturi acordate părților afiliate	392		
2.3. împrumuturi acordate aferente intereselor de participare	393		

	2.4. alte investiții financiare în părți afiliate	394		
	Total investiții financiare curente (rd.380 + rd.390)	400		
	IV. Numerar și documente bănești	410	844993	415167
	TOTAL ACTIVE CIRCULANTE (rd.290 + rd.370 + rd.400 + rd.410)	420	1706504	4264699
	TOTAL ACTIVE (rd.230 + rd.420)	430	1953948	5415372
	P A S I V			
C.	CAPITAL PROPRIU			
	I. Capital social și neînregistrat			
	1. Capital social	440	373026	373026
	2. Capital nevărsat	450	()	()
	3. Capital neînregistrat	460		
	4. Capital retras	470	()	()
	5. Patrimoniul primit de la stat cu drept de proprietate	480		
	Total capital social și neînregistrat (rd.440 + rd.450 + rd.460 + rd.470 + rd.480)	490	373026	373026
	II. Prime de capital	500		
	III. Rezerve			
	1. Capital de rezervă	510		
	2. Rezerve statutare	520		
	3. Alte rezerve	530		
	Total rezerve (rd.510 + rd.520 + rd.530)	540		
	IV. Profit (pierdere)			
	1. Corecții ale rezultatelor anilor precedenți	550	X	-5255
	2. Profit nerepartizat (pierdere neacoperită) al anilor precedenți	560	-2435232	-2435232
	3. Profit net (pierdere netă) al perioadei de gestiune	570	X	-698978
	4. Profit utilizat al perioadei de gestiune	580	X	()
	Total profit (pierdere) (rd.550 + rd.560 + rd.570 + rd.580)	590	-2435232	-3139465
V. Rezerve din reevaluare	600			
VI. Alte elemente de capital propriu	610			
TOTAL CAPITAL PROPRIU (rd.490 + rd.500 + rd.540 + rd.590 + rd.600 + rd.610)	620	-2062206	-2766439	
D.	DATORII PE TERMEN LUNG			
	1. Credite bancare pe termen lung	630		
	2. Împrumuturi pe termen lung	640		3353966
	din care:	641		
	2.1. împrumuturi din emisiunea de obligațiuni	642		
	inclusiv: împrumuturi din emisiunea de obligațiuni convertibile	642		
	2.2. alte împrumuturi pe termen lung	643		3353966
	3. Datorii comerciale pe termen lung	650		
	4. Datorii față de părțile afiliate pe termen lung	660		
	inclusiv: datorii aferente intereselor de participare	661		
	5. Avansuri primite pe termen lung	670		
	6. Venituri anticipate pe termen lung	680		
	7. Alte datorii pe termen lung	690		
TOTAL DATORII PE TERMEN LUNG (rd.630 + rd.640 + rd.650 + rd.660 + rd.670 + rd.680 + rd.690)	700		3353966	
DATORII CURENTE				
1. Credite bancare pe termen scurt	710			
2. Împrumuturi pe termen scurt, total	720	3204448	1468158	

E.	din care:	721		
	2.1. împrumuturi din emisiunea de obligațiuni	721		
	inclusiv: împrumuturi din emisiunea de obligațiuni convertibile	722		
	2.2. alte împrumuturi pe termen scurt	723	3204448	1468158
	3. Datorii comerciale curente	730	2878	1301947
	4. Datorii față de părțile afiliate curente	740	742937	1711371
	inclusiv: datorii aferente intereselor de participare	741		
	5. Avansuri primite curente	750		341964
	6. Datorii față de personal	760	49575	55
	7. Datorii privind asigurările sociale și medicale	770	15588	
	8. Datorii față de buget	780	705	4350
	9. Datorii față de proprietari	790		
	10. Venituri anticipate curente	800		
11. Alte datorii curente	810	23		
	TOTAL DATORII CURENTE (rd.710 + rd.720 + rd.730 + rd.740 + rd.750 + rd.760 + rd.770 + rd.780 + rd.790 + rd.800 + rd.810)	820	4016154	4827845
F.	PROVIZIOANE			
	1. Provizioane pentru beneficiile angajaților	830		
	2. Provizioane pentru garanții acordate cumpărătorilor/clientilor	840		
	3. Provizioane pentru impozite	850		
	4. Alte provizioane	860		
		TOTAL PROVIZIOANE (rd.830 + rd.840 + rd.850 + rd.860)	870	
	TOTAL PASIVE (rd.620 + rd.700 + rd.820 + rd.870)	880	1953948	5415372

SITUAȚIA DE PROFIT ȘI PIERDERE

de la 01.01.2020 până la 31.12.2020

Anexa 2

Indicatori	Cod rd.	Perioada de gestiune	
		precedenta	curenta
1	2	3	4
Venituri din vânzări, total	010	4176069	12381902
din care:			
venituri din vânzarea produselor și mărfurilor	011	3746303	11478666
venituri din prestarea serviciilor și executarea lucrărilor	012	11794	249374
venituri din contracte de construcție	013		
venituri din contracte de leasing	014		
venituri din contracte de microfinanțare	015		
alte venituri din vânzări	016	417972	653862
Costul vânzărilor, total	020	3149730	9837770
din care:			
valoarea contabilă a produselor și mărfurilor vândute	021	3149730	9837770
costul serviciilor prestate și lucrărilor executate terților	022		
costuri aferente contractelor de construcție	023		
costuri aferente contractelor de leasing	024		
costuri aferente contractelor de microfinanțare	025		
alte costuri aferente vânzărilor	026		
Profit brut (pierdere brută) (rd.010 - rd.020)	030	1026339	2544132
Alte venituri din activitatea operațională	040		1839
Cheltuieli de distribuire	050	28202	38549
Cheltuieli administrative	060	2269989	2605584
Alte cheltuieli din activitatea operațională	070	61021	176866
Rezultatul din activitatea operațională: profit (pierdere) (rd.030 + rd.040 - rd.050 - rd.060 - rd.070)	080	-1332873	-275028

Venituri financiare, total	090	453271	323541
din care:	091		
venituri din interese de participare			
inclusiv: veniturile obținute de la părțile afiliate	092		
venituri din dobânzi	093		
inclusiv: veniturile obținute de la părțile afiliate	094		
venituri din alte investiții financiare pe termen lung	095		
inclusiv: veniturile obținute de la părțile afiliate	096		
venituri aferente ajustărilor de valoare privind investițiile financiare pe termen lung și curente	097		
venituri din ieșirea investițiilor financiare	098		
venituri aferente diferențelor de curs valutar și de sumă	099	445964	323541
Cheltuieli financiare, total	100	261680	828557
din care:	101		84503
cheltuieli privind dobânzile			
inclusiv: cheltuielile aferente părților afiliate	102		
cheltuieli aferente ajustărilor de valoare privind investițiile financiare pe termen lung și curente	103		
cheltuieli aferente ieșirii investițiilor financiare	104		
cheltuieli aferente diferențelor de curs valutar și de sumă	105	261680	744054
Rezultatul: profit (pierdere) financiar(ă) (rd.090 - rd.100)	110	191591	-505016
Venituri cu active imobilizate și excepționale	120		384338
Cheltuieli cu active imobilizate și excepționale	130		303272
Rezultatul din operațiuni cu active imobilizate și excepționale: profit (pierdere) (rd.120 - rd.130)	140		81066
Rezultatul din alte activități: profit (pierdere) (rd.110 + rd.140)	150	191591	-423950
Profit (pierdere) pînă la impozitare (rd.080 + rd.150)	160	-1141282	-698978
Cheltuieli privind impozitul pe venit	170		
Profit net (pierdere netă) al perioadei de gestiune (rd.160 - rd.170)	180	-1141282	-698978

SITUAȚIA MODIFICĂRILOR CAPITALULUI PROPRIU

de la 01.01.2020 pînă la 31.12.2020

Anexa 3

Nr. d/o	Indicatori	Cod rd	Sold la începutul perioadei de gestiune	Majorări	Diminuări	Sold la sfîrșitul perioadei de gestiune
1	2	3	4	5	6	7
I.	Capital social și neînregistrat					
	1. Capital social	010	373026			373026
	2. Capital nevărsat	020	()	()	()	()
	3. Capital neînregistrat	030				
	4. Capital retras	040	()	()	()	()
	5. Patrimoniul primit de la stat cu drept de proprietate	050				
	Total capital social și neînregistrat (rd.010 + rd.020 + rd.030 + rd.040 + rd.050)	060	373026			373026
II.	Prime de capital	070				
III.	Rezerve					
	1. Capital de rezervă	080				
	2. Rezerve statutare	090				
	3. Alte rezerve	100				
	Total rezerve (rd.080 + rd.090 + rd.100)	110				
	Profit (pierdere)					
	1. Corecții ale rezultatelor anilor precedenți	120	X		5255	-5255

IV.	2. Profit nerepartizat (pierdere neacoperită) al anilor precedenți	130	-2435232			-2435232
	3. Profit net (pierdere netă) al perioadei de gestiune	140	X		698978	-698978
	4. Profit utilizat al perioadei de gestiune	150	X	()	()	()
	Total profit (pierdere) (rd.120 + rd.130 + rd.140 + rd.150)	160	-2435232		704233	-3139465
V.	Rezerve din reevaluare	170				
VI.	Alte elemente de capital propriu	180				
	Total capital propriu (rd.060 + rd.070 + rd.110 + rd.160 + rd.170 + rd.180)	190	-2062206		704233	-2766439

SITUAȚIA FLUXURILOR DE NUMERAR

de la 01.01.2020 până la 31.12.2020

Anexa 4

Indicatori	Cod rd	Perioada de gestiune	
		precedentă	curentă
1	2	3	4
Fluxuri de numerar din activitatea operațională			
Încasări din vânzări	010	4393674	13996800
Plăți pentru stocuri și servicii procurate	020	3945472	13833052
Plăți către angajați și organe de asigurare socială și medicală	030	1155010	1582458
Dobânzi plătite	040		
Plata impozitului pe venit	050		
Alte încasări	060		1839
Alte plăți	070	605401	270627
Fluxul net de numerar din activitatea operațională (rd.010 - rd.020 - rd.030 - rd.040 - rd.050 + rd.060 - rd.070)	080	-1312209	-1687498
Fluxuri de numerar din activitatea de investiții			
Încasări din vânzarea activelor imobilizate	090		
Plăți aferente intrărilor de active imobilizate	100		
Dobânzi încasate	110		
Dividende încasate	120		
inclusiv: dividende încasate din străinătate	121		
Alte încasări (plăți)	130		
Fluxul net de numerar din activitatea de investiții (rd.090 - rd.100 + rd.110 + rd.120 ± rd.130)	140		
Fluxuri de numerar din activitatea financiară			
Încasări sub formă de credite și împrumuturi	150	1597906	1283603
Plăți aferente rambursării creditelor și împrumuturilor	160		
Dividende plătite	170		
inclusiv: dividende plătite nerezidenților	171		
Încasări din operațiuni de capital	180		
Alte încasări (plăți)	190		
Fluxul net de numerar din activitatea financiară (rd.150 - rd.160 - rd.170 + rd.180 ± rd.190)	200	1597906	1283603
Fluxul net de numerar total (± rd.080 ± rd.140 ± rd.200)	210	285697	-403895
Diferențe de curs valutar favorabile (nefavorabile)	220	-19792	-25931
Sold de numerar la începutul perioadei de gestiune	230	579088	844993
Sold de numerar la sfârșitul perioadei de gestiune (± rd.210 ± rd.220 + rd.230)	240	844993	415167

DECLARAȚIE

Subsemnata Gabriela Anghel, reprezentant împuternicit al MEDIST GRUP S.R.L, cu sediul în mun. Chișinău, str. M.G. Bănulescu-Bodoni 25, Oficiul 33, declar pe propria răspundere că:

- vom asigura instalarea echipamentelor și instruirea personalului beneficiarului privind utilizarea echipamentelor livrate, organizate la sediul beneficiarului de către personalul autorizat al furnizorului.

- vom organiza inspecții planificate/ întreținere profilactică și calibrare conform recomandărilor producătorului și programului stabilit de comun acord cu beneficiarul, și mentenanța dispozitivelor pe durata perioadei de garanție, efectuate de către un inginer calificat.

- anul producerii echipamentelor este nu mai vechi de anul 2020 în conformitate cu specificația tehnică a lotului.

- pentru echipamentele oferite, se garantează o perioadă de reacție de jumătate de oră sau mai puțin la telefon și 24 ore sau mai puțin la sediul beneficiarului, în cazul apariției defecțiunilor tehnice.

- pentru echipamentele oferite, se asigură garanție nu mai mică de 24 luni din data instalării/ livrării, conform specificației tehnice pentru fiecare lot.

- bunurile contractate, cu IVD, sunt înregistrate în Registrul de Stat al Dispozitivelor Medicale a Agenției Medicamentului și Dispozitivelor Medicale

- pentru produse noi sau necunoscute vor fi prezentate mostre în termen de 5 zile de la solicitare

- suntem înregistrați în Lista Producătorilor, conform prevederilor HG 212/2018 privind gestionarea Echipamentelor Electrice și Electronice (EEE). Numărul de înregistrare este: MD2021-6-EEE-017.

Data: 09.09.2021

MEDIST GRUP S.R.L.
DIRECTOR
GABRIELA ANGHEL



DECLARATION OF CONFORMITY

Beckman Coulter Ireland, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below Conform to the European Union Directives and standards identified in this declaration.

Beckman Coulter Ireland, Inc. assure et déclare par la présente, que les produit(s) sous-mentionnés, sont conformes aux directives et normes Européennes identifiées dans cette déclaration

Beckman Coulter Ireland, Inc. dichiara ed assicura con la presente, che I prodotto(i) sottomenzionati sono in conformità con le direttive e norme Europee, specificate in questa dichiarazione.

Beckman Coulter Ireland, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die aufgeführten Produkt(e) in Übereinstimmung sind mit den Bestimmungen der angegebenen EU-Richtlinien und mit den aufgeführten normativen Dokumenten.

Beckman Coulter Ireland, Inc. asegura y declara por la presente que los producto(s) abajo mencionados, están conformes con las directivas y normas Europeas identificadas en esta declaración.

Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

Navios EX™ 6 Colors / 2 Laser	B80912	Navios™ 6 Colors / 2 Laser	A62101
Navios EX™ 8 Colors / 2 Laser	B80911	Navios™ 8 Colors / 2 Laser	A62102
Navios EX™ 10 Colors / 3 Laser	B80910	Navios™ 10 Colors / 3 Laser	A62103
Navios EX Acquisition New User Software v2.0 Win 7	B91237	Navios tetra Software v1.1 New User	775213
Navios EX Offline ACQ Single User Software v2.0 Win 7	B91238	Navios ACQ Upgrade Software v1.2	B21277
Navios EX Offline ACQ 5 Users Software v2.0 Win 7	B91239	Navios ACQ New User Software v1.3 Win 7	B47907
Navios EX Tetra Software v2.0 New User	B91240	Navios Offline ACQ Single User Software v1.3 Win 7	B47908
Navios EX Software v2.1	C33300	Navios Offline ACQ 5 Users Software v1.3 Win 7	B47909
Navios EX V2.2 Windows 10 SWRE KIT; Navios EX V2.2 UPGRADE	C54172S	Navios ACQ Upgrade Software v1.3 Win 7	B68875
SWRE KIT; Navios EX ACQUISITION NEW USER SOFTWARE VER 2.2, WIN 10	C64028	Navios ACQ Upgrade Software v1.3 Vista	B68876
SWRE KIT; Navios EX V2.2 offline ACQ Single user Win 10	C54027		
SWRE KIT; Navios EX V2.2 offline ACQ 5 users Win 10	C48622		

GMDN Codes: 67840, 43472

EU Directive(s) / EU-Richtlinien / Direttiva(e) Europee / Directives Européenne(s) / Directiva(s) Europeas:

- Low Voltage (2014/35/EU)
- Electromagnetic Compatibility (2014/30/EU)
- IVD Directive (98/79/EC)
- Machinery Directive (2006/42/EC)
- RoHS Directive (2015/863/EU)

Standard(s) / Norm(en) / Norma(e) / Norme(s) / Norma(s):

- EMC: EN 61326-1:2013
- EN 61326-2-6:2013
- Product Safety: EN 61010-1:2010
- EN 61010-2-081:2015
- EN 61010-2-101:2015
- RoHS: EN 63000:2018

Jeffrey Gonzalez, Senior Manager
Product Compliance Engineering

Date: July 19, 2021

Authorized Representative (AR)

Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan, O Callahan's Mills
Co Clare, Ireland

Document Control

Issue Date: July 24, 2009
Revision Level: 3.0
Revision Date: July 19, 2021
Starting Serial #: AN02001
Navios RoHS Serial #: AZ22259
Navios EX RoHS Serial #: AZ35307
Navios EX RoHS3 Serial #: BE25XXX

FileName: 2021-901-035I

Conformity Assessment Procedure
Annex III Self-Declared

CE MARK first affixed:
Navios: Jul 2009
Navios EX: Aug 2016



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Claire, Ireland

Certificate of Registration

QUALITY MANAGEMENT SYSTEM - ISO 9001:2015

This is to certify that:

Beckman Coulter International S.A.
22 Rue Juste-Olivier
CH-1260 Nyon 1
Switzerland

Holds Certificate No:

FM 663744

and operates a Quality Management System which complies with the requirements of ISO 9001:2015 for the following scope:

The sale, installation, service and distribution of products for biomedical testing and research and industrial applications.

For and on behalf of BSI:



Carlos Pitanga, Chief Operating Officer Assurance – Americas

Original Registration Date: 2017-05-26

Effective Date: 2020-05-26

Latest Revision Date: 2021-04-02

Expiry Date: 2023-05-25

Page: 1 of 4



...making excellence a habit.™

Certificate No: **FM 663744**

Location	Registered Activities
Beckman Coulter International S.A. 22 Rue Juste-Olivier CH-1260 Nyon 1 Switzerland	The sale, installation, service and distribution of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter d.o.o. Avenija Veceslava Holjevca 40 10020 Zagreb Croatia	The sale, installation, and service of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter Polska Sp z o.o. Al. Jerozolimskie 181 B 02-222 Warszawa Poland	The sale, installation, and service of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter Ceska republika s.r.o. Radiova 1 10227 Praha 10 Czech Republic	The sale, installation, and service of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter Magyarország Kft Papirgyar utca 58-59 H-1038 Budapest Hungary	The sale, installation, and service of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter Slovenská republika s.r.o. Digital Park II Einsteinova 23 85101 Bratislava Slovakia	The sale, installation, and service of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter Biyomedikal Urunler San ve Tic. Ltd. Sti. Askent Sokak No:3A Kosifler Is Merkezi, A Blok Kat: 8 Icerenkoy Atasehir Istanbul Turkey	The sale, installation, service and distribution of products for Biomedical testing, research, industrial applications and customs, foreign trade, logistics, management and administrative organization activities including related service organizations.
Beckman Coulter LLC Stanislavskogo Street 21 Building 3 109004 Moscow Russian Federation	The sale, installation, service and distribution of products for biomedical testing and research and industrial applications.

Original Registration Date: 2017-05-26

Effective Date: 2020-05-26

Latest Revision Date: 2021-04-02

Expiry Date: 2023-05-25

Page: 2 of 4

This certificate remains the property of BSI and shall be returned immediately upon request.

An electronic certificate can be authenticated [online](http://www.bsigroup.com/ClientDirectory). Printed copies can be validated at www.bsigroup.com/ClientDirectory To be read in conjunction with the scope above or the attached appendix.

Information and Contact: BSI, Kitemark Court, Davy Avenue, Knowlhill, Milton Keynes MK5 8PP. Tel: + 44 345 080 9000
BSI Assurance UK Limited, registered in England under number 7805321 at 389 Chiswick High Road, London W4 4AL, UK.
A Member of the BSI Group of Companies.

Certificate No: **FM 663744**

Location	Registered Activities
Beckman Coulter India Private Limited 3rd Floor B-Wing Art Guild House Phoenix Market City LBS Road Kurla (W), Mumbai 400 070 India	The sale, installation, service and distribution of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter Eastern Europe Distribution Center Radiova 1 10227 Praha 10 10227 Czech Republic	The distribution of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter India Pvt. Ltd. Building 6A, 5th Floor Unit 401 & 402 and Unit 501 & 502 RMZ Eco World Sarjapur Marathali Outer Ring Road Bangalore 560 103 India	Training
Beckman Coulter Saudi Arabia Ltd. Al Barrak Tower, 7th Floor Ibraheem Ahmad Al Reqy Street Al-Baghdadiyah Al-Gharbiyah Jeddah 22231 Kingdom of Saudi Arabia	The sale, installation, and service of products for biomedical testing and research and industrial applications.
Beckman Coulter Saudi Arabia Ltd. Sahab Tower, 3rd Floor, Office 24, Exit (10) King Abdullah Road, PO Box: 376400 Riyadh 11335 Kingdom of Saudi Arabia	The sale, installation, and service of products for biomedical testing and research and industrial applications.

Original Registration Date: 2017-05-26

Latest Revision Date: 2021-04-02

Effective Date: 2020-05-26

Expiry Date: 2023-05-25

Page: 3 of 4

This certificate remains the property of BSI and shall be returned immediately upon request.

An electronic certificate can be authenticated [online](http://www.bsigroup.com/ClientDirectory). Printed copies can be validated at www.bsigroup.com/ClientDirectory To be read in conjunction with the scope above or the attached appendix.

Information and Contact: BSI, Kitemark Court, Davy Avenue, Knowlhill, Milton Keynes MK5 8PP. Tel: + 44 345 080 9000
BSI Assurance UK Limited, registered in England under number 7805321 at 389 Chiswick High Road, London W4 4AL, UK.
A Member of the BSI Group of Companies.

Certificate No: **FM 663744**

Location

Beckman Coulter Biyomedikal Urunler
San. ve Tic. Ltd. Şti.
Fatih Mahallesi
Yakacık Caddesi
Türker Depo Kapı:8
Samandıra
İstanbul
Turkey

Registered Activities

Warehouse and distribution of products for biomedical testing
and research and industrial applications.



Original Registration Date: 2017-05-26

Latest Revision Date: 2021-04-02

Effective Date: 2020-05-26

Expiry Date: 2023-05-25

Page: 4 of 4

This certificate remains the property of BSI and shall be returned immediately upon request.

An electronic certificate can be authenticated [online](http://www.bsigroup.com/ClientDirectory). Printed copies can be validated at www.bsigroup.com/ClientDirectory
To be read in conjunction with the scope above or the attached appendix.

Information and Contact: BSI, Kitemark Court, Davy Avenue, Knowlhill, Milton Keynes MK5 8PP. Tel: + 44 345 080 9000
BSI Assurance UK Limited, registered in England under number 7805321 at 389 Chiswick High Road, London W4 4AL, UK.
A Member of the BSI Group of Companies.

Certificate of Registration

QUALITY MANAGEMENT SYSTEM - ISO 13485:2016 & EN ISO 13485:2016

This is to certify that:

Beckman Coulter, Inc.
250 South Kraemer Blvd.
Brea
California
92821
USA

Holds Certificate Number:

MD 670607

and operates a Quality Management System which complies with the requirements of ISO 13485:2016 & EN ISO 13485:2016 for the following scope:

The design and development, manufacture, distribution, installation, service and customer support of automated instruments, software, reagents, calibrators, controls and other consumables for use in in-vitro diagnostic medical devices



For and on behalf of BSI:

Gary E Slack, Senior Vice President - Medical Devices

Original Registration Date: 2017-04-12

Latest Revision Date: 2021-03-09

Effective Date: 2021-03-19

Expiry Date: 2021-09-18

Page: 1 of 3



003

...making excellence a habit.™

Certificate No: **MD 670607**

Location	Registered Activities
Beckman Coulter, Inc. 250 South Kraemer Blvd. Brea California 92821 USA	Design and development, manufacture, distribution, installation, service and customer support.
Beckman Coulter, Inc. 1000 Lake Hazeltine Drive Chaska Minnesota 55318 USA	Design and development, manufacture, distribution, installation, service and customer support.
Beckman Coulter, Inc. 2470 Faraday Avenue Carlsbad California 92010 USA	Design and development, manufacture and distribution.
Beckman Coulter, Inc. 2295 Progress Drive Hebron Kentucky 41048 USA	Distribution
Beckman Coulter, Inc. 5355 West 76th Street Indianapolis Indiana 46268 USA	Manufacture of service parts and sub-assemblies.
Beckman Coulter, Inc. 5350 Lakeview Parkway South Drive Indianapolis Indiana 46268 USA	Customer Support

Original Registration Date: 2017-04-12

Latest Revision Date: 2021-03-09

Effective Date: 2021-03-19

Expiry Date: 2021-09-18

Page: 2 of 3

This certificate was issued electronically and remains the property of BSI and is bound by the conditions of contract.

An electronic certificate can be authenticated [online](#).

Printed copies can be validated at www.bsigroup.com/ClientDirectory

Information and Contact: BSI, Kitemark Court, Davy Avenue, Knowlhill, Milton Keynes MK5 8PP. Tel: + 44 345 080 9000
BSI Assurance UK Limited, registered in England under number 7805321 at 389 Chiswick High Road, London W4 4AL, UK.
A Member of the BSI Group of Companies.

Certificate No: **MD 670607**

Location	Registered Activities
Beckman Coulter, Inc. 11800 SW 147th Avenue Miami Florida 33196 USA	Design and development, manufacture, distribution, installation, service and customer support.
Beckman Coulter, Inc. 740 West 83rd Street Hialeah Florida 33014 USA	Manufacture and distribution.
Beckman Coulter Inc. 7381 Empire Drive Florence Kentucky 41042 USA	Manufacture
Beckman Coulter GmbH Europark Fichtenhain B13 47807 Krefeld Germany	Manufacture
Beckman Coulter, Inc. Microbiology Business 2040 Enterprise Blvd. West Sacramento California 95691 USA	Manufacture and distribution
Beckman Coulter, Inc. Microbiology Business 1584 Enterprise Blvd. West Sacramento California 95691 USA	Design and development

Original Registration Date: 2017-04-12

Latest Revision Date: 2021-03-09

Effective Date: 2021-03-19

Expiry Date: 2021-09-18

Page: 3 of 3

This certificate was issued electronically and remains the property of BSI and is bound by the conditions of contract.
An electronic certificate can be authenticated [online](#).
Printed copies can be validated at www.bsigroup.com/ClientDirectory

Information and Contact: BSI, Kitemark Court, Davy Avenue, Knowlhill, Milton Keynes MK5 8PP. Tel: + 44 345 080 9000
BSI Assurance UK Limited, registered in England under number 7805321 at 389 Chiswick High Road, London W4 4AL, UK.
A Member of the BSI Group of Companies.

Certificate of Registration

QUALITY MANAGEMENT SYSTEM - ISO 13485:2016

This is to certify that:

**Immunotech SAS,
A Beckman Coulter Company**
130 Avenue de Lattre de Tassigny
BP 177
Marseille, Cedex 9
13276
France

Holds Certificate Number:

MD 670624

and operates a Quality Management System which complies with the requirements of ISO 13485:2016 for the following scope:

The design, development, manufacture and distribution of in-vitro diagnostic reagents and in-vitro diagnostic test kits used in the diagnosis, management and detection of cancer, endocrine disorders, fertility testing, prenatal screening, cardiac and sepsis markers, immune status, autoimmune diseases and bone metabolism disorders.

For and on behalf of BSI:

Stewart Brain, Head of Compliance & Risk - Medical Devices

Original Registration Date: 2017-04-12

Latest Revision Date: 2018-05-23

Effective Date: 2018-12-31

Expiry Date: 2021-12-30

Page: 1 of 1



003

...making excellence a habit.™



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD5-PC5.5, 50 tests (B49191)



Franck Cheillan
Director
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date :

May 27, 2015

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : May 26, 2015
Revision Lev : 01
Revision Date : May 26, 2015
Starting Lot # : 01
File Name : B49191 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD3-Pacific Blue, 50 tests (B49204)


Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 9-2-2016

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : February 09th, 2016
Revision Lev : 01
Revision Date : February 09th, 2016
Starting Lot # : 01
File Name : B49204 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.


Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD15-FITC, 100 tests (B36298)



Franck Cheillan
Director
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date :

March 31, 2014

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : Mar 31, 2014
Revision Lev : 01
Revision Date : Mar 31, 2014
File Name : B36298 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD10-APC-A700, 50 tests (B49223)

Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 27-5-2016

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : May 27th , 2016
Revision Lev : 01
Revision Date : May 27th , 2016
Starting Lot # : 01
File Name : B49223 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD11c-PC7, 100t (B96763)

Marie-Hélène PUXEDDU

Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

P/O:

Rémi Dumas
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 04/10/2017

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : October 04th, 2017
Revision Lev : 01
Revision Date : October 04th, 2017
Starting Lot # : 01
File Name : B96763 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD14-APC-Alexa Fluor 750 (B92421)

Marie-Hélène PUXEDDU
MHP Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

P/O:

Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date :

13 MARS 2017

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : December 13th, 2016
Revision Lev : 02
Revision Date : March 13, 2017
Starting Lot # : 01
File Name : B92421 dec CE rev 02



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Latre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD16-Pacific Blue (B36292)


Rémi Dumas
Director PreMarket/Validation/Quality
and Regulatory Affairs

Date: January 12, 2016

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : Mar 31, 2014
Revision Lev : 03
Revision Date : Jan.12, 2016
Starting Lot # 01
File Name : B36292 dec CE rev 03



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD19-ECD (A07770)

P/O: Marie-Hélène PUXEDDU
Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

Rémi Dumas
Director
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date: 26 Février 2018

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : Nov. 14, 2003
Revision Lev : 03
Revision Date : Feb. 26, 2018
File Name : A07770 DoC CE rev 03



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD20-ECD, 100t (B92433)


Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 13/12/2016

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : December 13th , 2016
Revision Lev : 01
Revision Date : December 13th , 2016
Starting Lot # : 01
File Name B92433 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD22-APC, 50t(B96777)

Marie-Hélène PUXEDDU
Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

P/o:

Rémi Dumas
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 04/10/2017

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : October 04th, 2017
Revision Lev : 01
Revision Date : October 04th, 2017
Starting Lot # : 01
File Name : B96777 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.


Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD23-FITC (IM0529)

P/o:  Marie-Hélène PUXEDDU
Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

Rémi Dumas
Director
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date: 26 Février 2018

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : Apr 21, 2005
Revision Lev : 02
Revision Date : February, 2018
File Name : IM0529 DoC CE rev 02



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.


Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD25-PC5 (IM2646)

P/O :  **Marie-Hélène PUXEDDU**
Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

Rémi Dumas
Director
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date: 26 Février 2018

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : Apr. 29, 2005
Revision Lev : 02
Revision Date : Feb. 26, 2018
File Name IM2646 DoC CE rev 02



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD33-PC5.5, 50 tests (B36289)

Franck Cheillan
Director
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date :

March 17, 2014

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : Mar 17, 2014
Revision Lev : 01
Revision Date : Mar 17, 2014
File Name : B36289 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD34-ECD, 100 tests (B49202)


Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 27-5-2016

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : May 27th , 2016
Revision Lev : 01
Revision Date : May 27th , 2016
Starting Lot # : 01
File Name B49202 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD38-APC-Alexa Fluor 750, (B49200)

Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 21-9-2015

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : September 21, 2015
Revision Lev : 01
Revision Date : September 21, 2015
Starting Lot # : 01
File Name : B49200 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed bellow comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD55-PE, 100 tests (B49190)


Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 9-2-2016

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : February 09th , 2016
Revision Lev : 01
Revision Date : February 09th , 2016
Starting Lot # : 01
File Name : B49190 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD56-APC-Alexa Fluor 700 (B92446)

Marie-Hélène PUXEDDU
Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

P/o:

Rémi Dumas
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date :

13 MARS 2017

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : January 30th, 2017
Revision Lev : 02
Revision Date : March 13, 2017
Starting Lot # : 01
File Name : B92446 dec CE rev 02



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD59-FITC, 100 tests (B49187)


Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 9-2-2016

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : February 09th , 2016
Revision Lev : 01
Revision Date : February 09th , 2016
Starting Lot # : 01
File Name : B49187 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

CD138-APC, 50 tests (B49219)

Rémi Dumas
Manager
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date :

19 SEP. 2016

**Conformity Assessment Procedure
Annex III**

Document Control

Issue Date : September 19th, 2016
Revision Lev : 01
Revision Date : September 19th, 2016
Starting Lot # : 01
File Name : B49219 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



Document:

Declaration of Conformity

Document #:

Revision 4.0

GLB-QS-TMP-0029

Declaration of Conformity

Beckman Coulter Ireland, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirement of the European Union In-vitro Diagnostics Medical Device Directive 98/79/EC.

Beckman Coulter Ireland, Inc. assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relative ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Producte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Beckman Coulter Ireland, Inc. asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/EC de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) /Produkt(e) /Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

ClearLLab 10C B Cell Tube PN: B96805

Conformity Assessment Procedure
Annex III - Self-Declared

Classification:
General

GMDN Code: 56917

Nery Ortiz

Senior Manager, Regulatory Affairs

05 Jun 2020

Date



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland

Document Control
Issue Date: October 11, 2018
Revision Level: 2.0
Revision Date: June 4, 2020
Starting Lot #: 280520
Filename: B96805DEC



Declaration of Conformity

Beckman Coulter Ireland, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirement of the European Union In-vitro Diagnostics Medical Device Directive 98/79/EC.

Beckman Coulter Ireland, Inc. assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relative ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Beckman Coulter Ireland, Inc. asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/EC de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) /Produkt(e) /Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

ClearLLab 10C M1 Cell Tube PN: B96807

Conformity Assessment Procedure
Annex III - Self-Declared

Classification:
General

GMDN Code: 56917

Nery Ortiz
Senior Manager, Regulatory Affairs

05 Jun 2020

Date



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland

Document Control
Issue Date: October 11, 2018
Revision Level: 2.0
Revision Date: June 4, 2020
Starting Lot #: 280520_02
Filename: B96807DEC



Document:
Declaration of Conformity

Document #: Revision 4.0
GLB-QS-TMP-0029

Declaration of Conformity

Beckman Coulter Ireland, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirement of the European Union In-vitro Diagnostics Medical Device Directive 98/79/EC.

Beckman Coulter Ireland, Inc. assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relative ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Producte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Beckman Coulter Ireland, Inc. asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/EC de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) /Produkt(e) /Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

ClearLLab 10C T Cell Tube PN: B96806

Conformity Assessment Procedure
Annex III - Self-Declared

Classification:
General

GMDN Code: 56917

Nery Ortiz
Senior Manager, Regulatory Affairs

05 Jun 2020
Date



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismechan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland

Document Control
Issue Date: October 11, 2018
Revision Level: 2.0
Revision Date: June 4, 2020
Starting Lot #: 280520_01
Filename: B96806DEC



Declaration of Conformity

Beckman Coulter, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirement of the European Union In-vitro Diagnostics Medical Device Directive 98/79/EC.

Beckman Coulter, Inc. assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Beckman Coulter, Inc. dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Beckman Coulter, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Beckman Coulter, Inc. asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/EC de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) /Produkt(e) /Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

Product Name
CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-
ECD


Part Number (PN)
737659

Authorized Representative (AR)
Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH – 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

Conformity Assessment Procedure
Annex III –Self-declared

Classification:
General

GMDN Code(s):
56917



Nery Ortiz
Sr. Manager Regulatory Affairs

13 Nov 2018
Date



Beckman Coulter, Inc.
2505. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 USA

Document Control
Issue Date: June 29, 2005
Revision Level: 5.0
Revision Date: October 3rd, 2018
Starting Lot #: 7974050F
Filename: 737659DEC



Declaration of Conformity

Beckman Coulter Ireland, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirement of the European Union In-vitro Diagnostics Medical Device Directive 98/79/EC.

Beckman Coulter Ireland, Inc. assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relative ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Producte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Beckman Coulter Ireland, Inc. asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/EC de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) /Produkt(e) /Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

PRODUCT NAME	PART NUMBER	GMDN
FLOW-CHECK PRO FLUOROSPHERES	A63493	55864

Conformity Assessment Procedure
Annex III Self-Declared



Anthony Dennis
Senior Manager, Regulatory Affairs

3/1/19
Date

Document Control
Issue Date: 11/30/2012
Revision Level: 6.0
Revision Date: 03/1/2019
Starting Lot #: N/A
Filename: A63493DEC



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland



Declaration of Conformity

Beckman Coulter Ireland, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirement of the European Union In-vitro Diagnostics Medical Device Directive 98/79/EC.

Beckman Coulter Ireland, Inc. assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relative ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Beckman Coulter Ireland, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Beckman Coulter Ireland, Inc. asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/EC de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) /Produkt(e) /Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

Product Name	Part Number	GMDN
Flow-Set Pro Fluorospheres	A63492	55864

Conformity Assessment Procedure
Annex III - Self-Declared

Classification:
General

Anthony Dennis
Senior Manager, Regulatory Affairs

3/1/19
Date



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland

Document Control
Issue Date: November 30, 2012
Revision Level: 7.0
Revision Date: October 11, 2018
Starting Lot #: 3941084F
Filename: A63492DEC



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Produit(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

Anti-HLA-DR-FITC, 100t (B96758)

Marie-Hélène PUXEDDU

Senior Engineer
Quality Assurance
And Regulatory Affairs

P/O:

Rémi Dumas
Quality Assurance & Regulatory Affairs

Date : 04/10/2017

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : October 04th, 2017
Revision Lev : 01
Revision Date : October 04th, 2017
Starting Lot # : 01
File Name : B96758 dec CE rev 01



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France



DECLARATION OF CONFORMITY

Beckman Coulter Ireland, Inc. hereby ensures and declares that the product(s) listed below Conform to the European Union Directives and standards identified in this declaration.

Beckman Coulter Ireland, Inc. assure et déclare par la présente, que les produit(s) sous-mentionnés, sont conformes aux directives et normes Européennes identifiées dans cette déclaration

Beckman Coulter Ireland, Inc. dichiara ed assicura con la presente, che I prodotto(i) sottomenzionati sono in conformità con le direttive e norme Europee, specificate in questa dichiarazione.

Beckman Coulter Ireland, Inc. versichert und erklärt hiermit, daß die aufgeführten Produkt(e) in Übereinstimmung sind mit den Bestimmungen der angegebenen EU-Richtlinien und mit den aufgeführten normativen Dokumenten.

Beckman Coulter Ireland, Inc. asegura y declara por la presente que los producto(s) abajo mencionados, están conformes con las directivas y normas Europeas identificadas en esta declaración.

Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Produit(s) / Producto(s):

Navios EX™ 6 Colors / 2 Laser	B80912	Navios™ 6 Colors / 2 Laser	A62101
Navios EX™ 8 Colors / 2 Laser	B80911	Navios™ 8 Colors / 2 Laser	A62102
Navios EX™ 10 Colors / 3 Laser	B80910	Navios™ 10 Colors / 3 Laser	A62103
Navios EX Acquisition New User Software v2.0 Win 7	B91237	Navios tetra Software v1.1 New User	775213
Navios EX Offline ACQ Single User Software v2.0 Win 7	B91238	Navios ACQ Upgrade Software v1.2	B21277
Navios EX Offline ACQ 5 Users Software v2.0 Win 7	B91239	Navios ACQ New User Software v1.3 Win 7	B47907
Navios EX Tetra Software v2.0 New User	B91240	Navios Offline ACQ Single User Software v1.3 Win 7	B47908
Navios EX Software v2.1	C33300	Navios Offline ACQ 5 Users Software v1.3 Win 7	B47909
Navios EX V2.2 Windows 10 SWRE KIT; Navios EX V2.2 UPGRADE	C54172S	Navios ACQ Upgrade Software v1.3 Win 7	B68875
SWRE KIT; Navios EX ACQUISITION NEW USER SOFTWARE VER 2.2, WIN 10	C64028	Navios ACQ Upgrade Software v1.3 Vista	B68876
SWRE KIT; Navios EX V2.2 offline ACQ Single user Win 10	C54027		
SWRE KIT; Navios EX V2.2 offline ACQ 5 users Win 10	C48622		

GMDN Codes: 67840, 43472

EU Directive(s) / EU-Richtlinien / Direttiva(e) Europee / Directives Européenne(s) / Directiva(s) Europeas:

- Low Voltage (2014/35/EU)
- Electromagnetic Compatibility (2014/30/EU)
- IVD Directive (98/79/EC)
- Machinery Directive (2006/42/EC)
- RoHS Directive (2015/863/EU)

Standard(s) / Norm(en) / Norma(e) / Norme(s) / Norma(s):

- EMC: EN 61326-1:2013
EN 61326-2-6:2013
- Product Safety: EN 61010-1:2010
EN 61010-2-081:2015
EN 61010-2-101:2015
- RoHS: EN 63000:2018

Jeffrey Gonzalez, Senior Manager
Product Compliance Engineering

Date: July 19, 2021

Authorized Representative (AR)

Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan, O Callahan's Mills
Co Clare, Ireland

Document Control

Issue Date: July 24, 2009
Revision Level: 3.0
Revision Date: July 19, 2021
Starting Serial #: AN02001
Navios RoHS Serial #: AZ22259
Navios EX RoHS Serial #: AZ35307
Navios EX RoHS3 Serial #: BE25XXX

FileName: 2021-901-035I

Conformity Assessment Procedure
Annex III Self-Declared

CE MARK first affixed:
Navios: Jul 2009
Navios EX: Aug 2016



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Claire, Ireland



DECLARATION OF CONFORMITY

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, assure et déclare par la présente que le(s) produit(s) listé(s) ci-dessous sont conformes aux exigences de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, ensures and declares that the product(s) listed below comply with the requirements of the European Union In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/CE.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, versichert und erklärt hiermit, daß die im Folgenden aufgeführten Produkte den Auflagen der IVD-Richtlinie für In-Vitro-Diagnostika der Europäischen Union (98/79/EC) entsprechen.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, dichiara ed assicura che i prodotti qui elencati sono conformi ai requisiti della direttiva comunitaria 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

Immunotech S.A.S., a Beckman Coulter Company, asegura y declara que los productos listados a continuación cumplen con los requisitos establecidos en la directiva 98/79/CE de la Comunidad Europea para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

Product(s) / Product(s) / Produkt(e) / Prodotto(i) / Producto(s) :

VersaLyse Lysing Solution (A09777)

Rémi Dumas
Director PreMarket/Validation/Quality and Regulatory Affairs

Date: March 16, 2016

Conformity Assessment Procedure
Annex III

Document Control

Issue Date : Nov. 27, 2003
Revision Lev : 04
Revision Date : March 16, 2016
Starting Lot # 01
File Name A09777 dec CE rev 04



IMMUNOTECH S.A.S.
130 Avenue de Lattre de Tassigny - BP177
13276 Marseille cedex 9, France

DuraClone IM Phenotyping BASIC Tube, 25 tests, RUO

REF B53309 – 25 tests

IFU- B53309 - 3.0



	Specifications of Constituent 1	Specifications of Constituent 2	Specifications of Constituent 3	Specifications of Constituent 4	Specifications of Constituent 5	Specifications of Constituent 6	Specifications of Constituent 7	Specifications of Constituent 8
Specificity	CD16	CD56	CD19	CD14	CD4	CD8	CD3	CD45
Clone	3G8	N901	J3_119	RM052	13B8.2	B9.11	UCHT-1	J33
Immunogen	Human neutrophils	Human chronic myeloid leukemia cells	SK LY18 Lymphoma Hybridoma	Human monocytes	Human thymocytes	Cytotoxic human T clone HLA A2	T cell line + IL2	Laz 221 cell line
Isotype	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Species	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse
Source	Ascites fluid or supernatant of in vitro cultured hybridoma cells							
Purification	Affinity chromatography							
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X(ECD)	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Allophycocyanin(A PC)	Alexa Fluor 700 (A700)	Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Krome Orange
λ Excitation	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633nm	633 nm	405 nm
Emission peak	525 nm	575 nm	613 nm	770 nm	660 nm	720nm	775 nm	528 nm

**For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.**

BACKGROUND

Lymphocytes constitute a part of the human immune system that is referred to as “adaptive” due to their ability to acquire cognition and memory of foreign antigens. ¹ B cells (CD45+CD19+) represent the principal part of the humoral branch of adaptive immunity producing antibodies upon terminal differentiation. The cell-mediated adaptive immune response is mainly due to T cells (CD45+CD3+) that comprise a large number of functionally diverse entities with the highest level of discrimination - though not encompassing all T cells, being either CD4+ or CD8+.

While CD4+ T cells play a key role in balancing humoral, cell-mediated as well as innate immune responses, e.g. by means of cytokine secretion; CD8+ T cells are mainly responsible for Major Histocompatibility Complex (MHC) - mediated recognition and killing of tumor and virus-infected cells. The CD45+CD3-CD56+ phenotype identifies Natural Killer (NK) cells that complement the specificity of T cell receptors and immunoglobulins by the recognition of the “missing self”, i.e. the absence of host-matched MHC molecules presenting processed antigens on the membrane surface. Being a part of the innate human immune system, monocytes (CD45+CD14+) play a key role in bacterial defense. Expression of the Lipopolysaccharide (LPS, endotoxin) receptor CD14 is dense on the majority of monocytes bearing a classical phenotype.²

APPLICATION

The DuraClone IM panels are used to identify cell subpopulations in human whole blood samples by flow cytometry.

The IM Phenotyping BASIC Tube is an 8-color, 8-monoclonal antibody reagent that allows the identification of common extracellular markers of different subpopulations of lymphocytes, present in whole blood specimens.

This reagent is intended to be used on a flow cytometer with three lasers:

- A 488 nm laser with detectors dedicated to detection of light scatter (forward and side) and fluorescence emission in the following ranges: 504-545 nm, 560 – 600 nm, 605 – 635 nm, 680 – 710 nm and >755 nm.
- A 633 nm laser with detectors dedicated to detection of fluorescence emission in the following ranges: 650-670 nm, 715-735 nm and > 755 nm.
- A 405 nm laser with detectors dedicated to detection of fluorescence emission in the following ranges: 430-470 nm and 530-570 nm.

PRINCIPLE

This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by lymphocytes. Specific staining of the leukocytes is performed by incubating the sample with IM Phenotyping BASIC Tube. The erythrocytes are then removed by lysis and the leukocytes, which are unaffected by this process of lysis are acquired and analyzed by flow cytometry. The flow cytometer measures light diffusion and the fluorescence of cells; it enables the delimitation of the population of interest within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the diffusion of narrow angle light (Forward Scatter or FS). Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer can be used as supports in the gating stage. The fluorescence of the delimited cells is analyzed in order to distinguish the positively stained events from the unstained events. The gating strategy allows detection of circulating lymphocyte subpopulations. The results are expressed as a percentage of positive events.

KIT BOX CONTENTS

DuraClone IM Phenotyping BASIC Tube, 25 tests, RUO contains the following:

- 25 tests of the DuraClone IM Phenotyping BASIC Tube (i.e. a single tube is a single test)
- 3 Compensation Kits, each kit containing eight tubes, each of a single color; i.e.
 - CD4-FITC
 - CD4-PE
 - CD19-ECD
 - CD14-PC7
 - CD4-APC
 - CD8-A700
 - CD3-APC-A750
 - CD8-Krome Orange

STATEMENT OF WARNINGS

1. For stability information of DuraClone IM Basic Tube, 25 tests, RUO refer to the Certificate of Analysis (COA).
2. Discard reagent tubes, as per applicable regulations.
3. Do not store the reagent tubes in the refrigerator; do not freeze/thaw the tubes.
4. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care. Protective gloves, gowns and goggles must be used while handling blood samples.
5. Discard reagent tubes containing processed samples, as per applicable regulations, after sample acquisition and analysis.
6. Minimize the exposure of the tubes to light, especially during incubation of sample(s) during processing of sample(s), before acquisition.
7. Only calibrated instruments, as per the manufacturer's instructions, should be used.

8. Seal the zip lock of the pouch containing reagent tubes after removing the desired number of tests.
9. Reagent tubes must be stored within the sealed pouch containing desiccant packs to prevent the tubes from being exposed to moisture.

STORAGE CONDITIONS

Store the reagent tubes and compensation kit tubes between 20 and 30°C, in a dry place and protect it from the direct exposure to light and moisture. Refer to the kit label for the date of expiry of the reagent.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any damage to the panel tube may indicate product deterioration and the product should not be used. Please contact your local distributor or you can contact Beckman Coulter at the following email address: duraclone-support@beckman.com

INSTRUMENT REQUIREMENTS

This reagent is designed to be used on a flow cytometer capable of detecting forward and side scatter, and compatible with the emission spectra of the fluorochromes used in the reagent. This reagent is compatible with Navios*.

SPECIMEN COLLECTION

The venous blood sample should be collected in a blood collection tube containing anticoagulant. Follow the collection tube manufacturer's guidelines for the minimum volume of blood to be collected. The sample must be stored between 18°C and 25°C.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Blood collection tube containing anticoagulant
- Calibrated pipettes
- Vortex mixer
- Sheath fluid
- Flow cytometer calibration beads
- Flow-Check Pro Fluorospheres (REF. A69183)
- Flow-Set Pro Fluorospheres (REF. A69184)
- VersaLyse Solution (REF. A09777)
- IOTest 3 Fixative Solution (REF. A07800)
- Flow cytometer

PROCEDURE SAMPLE PREPARATION

1. Add 100 µL of fresh whole blood to the dried reagent tube, vortex at high speed for 6-8 seconds and incubate the tube for 15 minutes, protected from the direct exposure to light between 20 and 30°C.
2. Add 2 mL of VersaLyse, vortex the tube at high speed for 1-3 seconds and incubate the tube for 15 minutes, protected from the direct exposure to light, between 20 and 30°C.

- Centrifuge the tube at 200 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet.
- Perform a wash step by re-suspending the cell pellet in 3 mL 1X PBS and centrifuging the tube at 200 x g for 5 minutes. Aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet and re-suspend in 500 µL of 1X PBS containing 0.1% formaldehyde. This can be prepared by adding 1 mL of PBS to 12.5 µL of IOTest@3 10X Concentrate. The sample is now ready for acquisition.

COMPENSATION SETUP

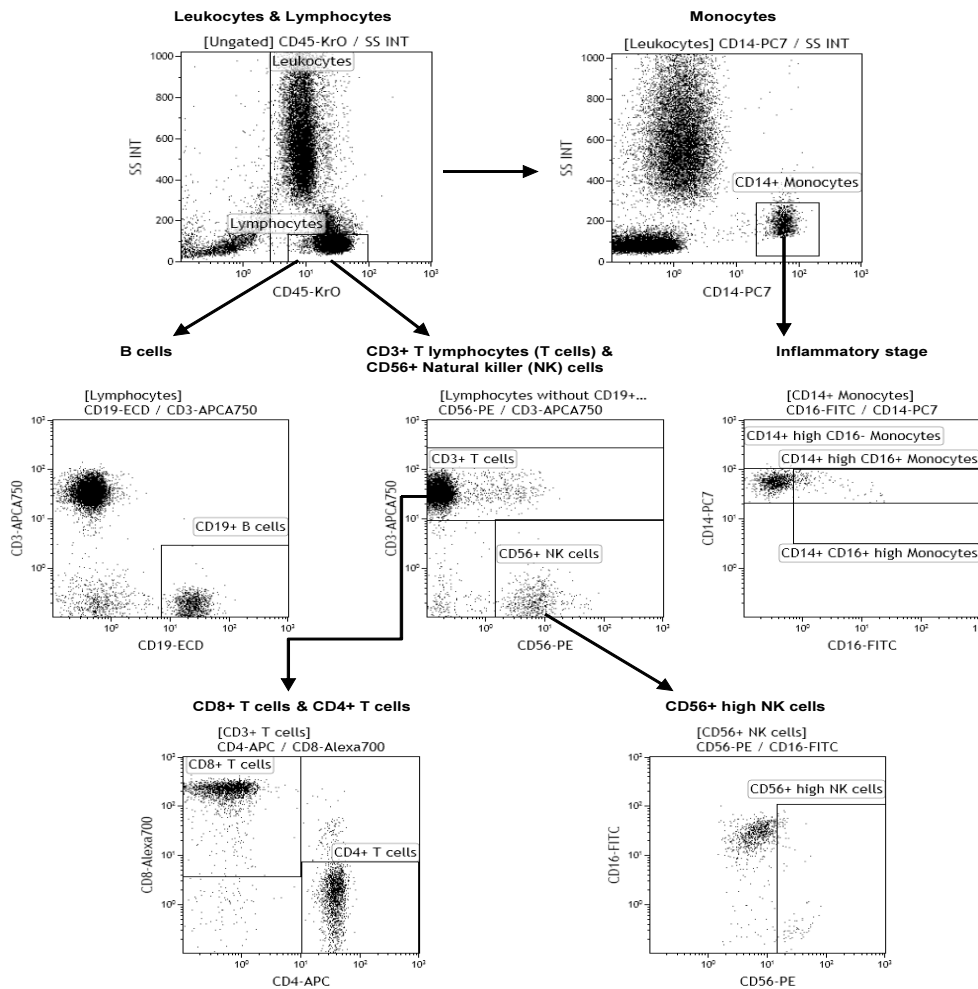
- Stain all the eight single color tubes from a single pouch of the Compensation Kit provided in the IM DuraClone Phenotyping BASIC Tube, 25 tests, RUO

with venous blood by following steps 1-4 in the sample preparation procedure.

- For sample acquisition on Navios: The AutoSetup Scheduler on the Navios groups the selected applications for efficient set up in sampling from common compensation samples when scheduling multiple applications and provides the carousel load report to facilitate setting up and loading samples for daily QC.
- For setting up compensation using AutoSetup Scheduler, refer to the Application Note "Compensation Setup for High Content DuraClone reagents", downloadable from the Beckman Coulter website: <http://beckman.com/applications/immune-monitoring>.

- Ensure that the compensation tubes are run in the following order:
 - CD4-FITC
 - CD4-PE
 - CD19-ECD
 - CD14-PC7
 - CD4-APC
 - CD8-A700
 - CD3-APC-A750
 - CD8-Krome Orange
- For all other flow cytometer users, please follow standard procedures and instrument manufacturer instructions for compensation setup.

FIGURE



- Create an appropriate analysis protocol to define the population gates and the series of dual parameter plots for analysis of the reagent specificities.
- Set the discriminator on the FS parameter such that the lymphocytes are not excluded from the acquisition.
- Create a CD45-KrOrange (Krome Orange) vs. SSC dot plot and create a region to encompass the CD45+ leukocytes.
- Create three plots as follows:
 - Create a CD14- PC7 vs. SSC dot plot and apply the CD45+leukocyte gate onto this plot and draw a region to encompass the CD14+ cells. These cells are the monocytes.
 - Create a CD19- ECD vs. D3-APC-A750 dot plot and draw a region to encompass the CD19+ cells. These cells are the B lymphocytes (i.e. B cells).
 - Create a CD56-PE vs. CD3-APC-A750 dot plot. Create a Boolean gate "Lymphocytes AND (NOT

CD19+)" and apply this gate i.e. lymphocytes without the CD19+ B cells) to the plot. Draw a region to encompass the CD56+ and CD3+ cell populations. The CD56+ cells are the Natural Killer (NK) cells and the CD3+ cells are the CD3 + T lymphocytes (T cells).

- Create a CD56-PE vs. CD16-FITC dot plot.
 - Apply the gate from the CD56-PE vs. CD3-APC-A750 dot plot.
 - Draw a region to encompass the CD56+ high NK cells.
- Create a CD4-APC vs. CD8-A700 (i.e. Alexa Fluor 700) dot plot.
 - Apply the gate CD3+ T Cells gate from the CD56-PE vs. CD3-AA750 dot plot.
 - Draw a region to encompass the CD4+ T cells and another region to encompass the CD8+ T cells.
- Create CD16-FITC vs. CD14-PC7 dot plot.

- Apply the CD14+ gate onto this plot.
- regions to encompass the following cell populations:-
 - The CD 14+ high CD16- monocytes
 - The CD 14+ high CD16+ monocytes
 - The CD14+ CD16 high monocytes
- Record the % recruitment and the mean fluorescence intensity (MFI) of all the gated cell populations.


REFERENCES

- Paul W.E. (ed.) (2003). Fundamental Immunology (4th ed.). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a refined definition of monocyte subsets. Front Immunol. 2013 Feb 4; 4:23.



PRODUCT AVAILABILITY

DuraClone IM Phenotyping BASIC Tube, 25 tests, RUO

 B53309

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

*Navios is CE marked for 10-color in vitro diagnostic (IVD) use. In the U.S.A., Navios is intended for use as an IVD device for immunophenotyping with Navios tetra software and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 reagents. All other uses are for research use only (RUO).

Immunotech and the Immunotech product marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Immunotech SAS, in the United States and other countries. Immunotech is a Beckman Coulter company.

Alexa Fluor 700 and Allophycocyanin Alexa Fluor 750 are trademarks of Molecular Probes, Inc.

For additional information, or if a damaged product is received, email Beckman Coulter Customer Service at duraclone-support@beckman.com or contact your local Beckman Coulter Representative.



Beckman Coulter India Pvt. Ltd.
50-B, II Phase, Peenya Industrial Area
Peenya, Bangalore 560058, India

Printed in India

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision History

Revision 3.0, March 2018

Changes were made to:

- Complete rewrite



	Specificații
Specificitate	CD3
Clonă	UCHT1
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Lignée T + IL2
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Pacific Blue
Raport molar	Pacific Blue/Ig: 1,7 - 3,2
Excitare λ	405 nm
Vârful de emisie	455 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest CD3-Pacific Blue

REF B49204 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea și enumerarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD3 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOTest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD3 este o proteină transmembranară care conține patru tipuri de lanțuri de polipeptide: CD3γ, CD3δ, CD3ε și CD3ζ. CD3 este asociată cu receptorul de celule T (TCR) pentru a forma complexul TCR, care este responsabil pentru funcțiile de dezvoltare, activarea și efectoare ale celulelor T (1). Cozile intracelulare ale moleculelor CD3 conțin un motiv unic conservat, cunoscut drept motiv de activare a imunoreceptorului bazat pe tirozină sau ITAM, care este esențial pentru capacitatea de semnalare a TCR (2, 3).

CD3 este prezent în citoplasma pro-thimocitelor și apoi în timocitele medulare atunci când antigenul CD3 începe să migreze în membrana celulei (4). CD3-ul din membrană este prezent în toate celulele T mature și în celulele NK-T. Analiza fenotipică a CD3 poate fi realizată prin detecția domeniilor membranei de suprafață sau a cozi intracelulare. CD3 este un marker selectiv pentru linia de celule T și prezența sa se menține la majoritatea afecțiunilor maligne ale celulelor T (5, 6).

CD3 este prin urmare inclus într-o vastă majoritate de panouri de citometrie de flux pentru diagnoza bolilor limfoproliferative hematologice ale celulelor T, inclusiv leucemia și limfoamele (5, 6, 7). Analiza imunofenotipică a celulelor CD3+ realizată împreună cu alte fenotipuri de celule permite caracterizarea rapidă a diferitelor subseturi funcționale de celule T, cum ar fi celule de memorie, celule efectoare și celule T reglatoare (8).

Studierea numerelor relative și absolute de lanțuri CD3+ este utilă pentru evaluarea imunocompetenței în anumite stadii de imunodeficiență (de exemplu: HIV, post-transplant de celule stem hematopoietice) și anumite răspunsuri la terapie, dar este rar folosită pentru a lua decizii în privința tratamentului (9, 10). CD3 mai este folosit pentru diagnosticarea și/sau monitorizarea activității celulelor T la pacienți care suferă de imunodeficiențe primare sau secundare, autoimunitate și răspuns la terapia de imunosupresie cu terapii anti celule T monoclonale și globulină anti-timus (11, 12, 13, 14, 15, 16).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckmancoulter.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Probele trebuie păstrate la temperatura camerei (18–25°C) și nu trebuie agitate. Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: Pacific Bluereactiv IOTest (REF A74764)
- Anticorpi conjugați specifici -Pacific Blue din gama IOTest.
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalyse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A74764)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Limfocitele T reprezintă majoritatea limfocitelor din sângele uman periferic (PBL) (17). Limfocitele T sunt caracterizate prin prezența antigenului CD3 (17, 18). Antigenul CD3 este un complex de 5 lanțuri polipeptidice: γ , δ , ϵ , ζ și η , asociate cu complexul receptor de celule T (TCR) (19).

Lanțurile CD3 sunt înglobate într-un grup de doi dimeri invariabili, γ/ϵ și δ/ϵ , asociați cu un dimer variabil care constă în homodimeri ζ sau heterodimeri ζ/η sau ζ/γ FcR (γ FcR reprezentând lanțul γ de receptori Fc) sau homodimeri γ FcR (19, 20, 21). Complexul CD3 asociat cu TCR este implicat în recunoașterea peptidelor legate la complexul de histocompatibilitate major clasa I și II în cadrul răspunsului imun (22).

Antigenul CD3 este prezent în limfocite T mature și într-un subset de timocite (23).

Anticorpul monoclonal UCHT1 reacționează cu lanțul ϵ al complexului CD3 (24). El a fost asociat clusterului CD3 de diferențiere la 1st International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Primul simpozion pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor), organizat la Paris, Franța, în 1982 (25).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (26). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Limfocite+ CD3-Pacific Blue	4,0 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2
Limfocite + CD3-Pacific Blue	10	78,18	77,52	0,58	0,73	0,74	0,94

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (27).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (28).

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Pacific Blue este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD5
Clonă	BL1a
Hibridom	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Lymphocytes from human thoracic duct
Imunoglobulină	IgG2a
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
Raport molar	PC5,5/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	692 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD5-PC5.5

REF B49191 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD5 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD5 este un receptor tip multifuncțional care este prezent în asociere cu receptori specifici antigenului la limfocitele T și B-1a. CD5 joacă rol de regulator pentru moartea celulelor și ca receptor inhibitor pentru modele moleculare asociate patogenului.

CD5 este un marker de celule T prezent în afecțiuni maligne ale celulelor B mature și în alte boli limfoproliferative cronice ale celulelor B. Prezența CD5 este utilă pentru detectarea limfocitozei T monoclonale oculte și pentru diagnosticarea neoplasmelor de celule T fără leucocitoză și fără dovezi de neoplazii în morfologia celulelor. Prezența CD5 este consecventă la celule B normale, politipice în etapele continuum, predominantă și finale ale maturării și la celule B mature. Analiza simultană a antigenilor CD5, CD19 și CD23 permite diferențierea mai precisă a diferitelor proliferări de celule B, cum ar fi leucemiile limfoide cronice ale celulelor B și limfoame ca celule mici, care sunt CD5+ CD23+CD19+, sau limfoamele de mantă, care sunt CD5+CD23– CD19+ (1,2,3,4,5,6).

CD5 este folosit în diagnosticul diferențial pentru o serie de limfoame prezente în sângele periferic (cu manifestări leucemice), cum ar fi: a) limfomul folicular CD5 pozitiv, b) analiza bolii reziduale minime din limfoamele non-Hodgkin CD5+ celule B, c) limfoame foliculare CD5 pozitive; d) limfoame difuze CD5 pozitive (CD5+) de celule mari B (DLBCL); e) limfoame de zonă marginală (SP-MZL). CD5 este considerat un prognostic independent negativ pentru limfoamele difuze extrem de agresive cu celule mari B (7,8).

Analiza simultană a antigenilor CD5, CD19 și CD10 ajută la caracterizarea diferitelor neoplazii ale celulelor B (6), cum ar fi leucemiile limfoide cronice ale celulelor B și limfoame de celule mici, care sunt CD5+CD10– CD19+, și a limfoamelor foliculare, care sunt CD5– CD10+ CD19+ (1,2). Această analiză mai permite și diferențierea leucemiilor limfoblastice acute B (B-ALL) și a leucemiilor limfoblastice acute pre-B, care sunt CD5– CD10+CD19+, de leucemiilor prolimfocitice, care sunt CD5– CD10– CD19+ (3,9,10,11,12).

Leucemiile limfocitice cronice (CLL) sunt caracterizate prin expansiunea clonală a celulelor B CD5(+)/CD23(+) în sânge, în măduvă și în țesuturi limfoide secundare. Realizarea profilurilor de prezență a genelor și studiile fenotipice sugerează faptul că bolile CLL sunt probabil derivate din celule B CD5(+) similare celor care se găsesc în sângele adulților sănătoși (12).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.

În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.

7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.

- Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
- Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS

Fișa tehnică de securitate este disponibilă la
beckman.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalyse

- În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
- Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
- Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
- Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

- Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
- Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
- Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
- Repețiți pasul 5.
- Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Molecula CD5 este prezentă la suprafața limfocitelor T mature, în majoritatea timocitelor și într-o sub-populație de limfocite B (13,14,15). CD5 este prezent într-un subset de celule B care secretă IgM datorită absenței transferazei deoxinucleotidil de terminal enzimatic (TdT) care apare la activarea BSR, reducând prin urmare autoreactivitatea (reacția autoimună). Din contră, în celulele T sunt prezente niveluri de CD5 mai ridicate decât în celulele B. CD5 este reglementat în sus la celule T la activare puternică. În timus există o corelare între prezența CD5 și puterea interacțiunii celulei T spre peptide self. CD5 nu este prezent în granulocite, monocite și trombocite (15). Anticorpul monoclonal BL1a a fost asociat cu CD5 la 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al 3-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor), organizat la Oxford, Anglia, în 1986 (Cod WS: 520, Secțiune T) (13,14).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (16). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Limfocite+ CD5-PC5,5	7,0 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Limfocite + CD5-PC5,5	10	82,34	77,17	0,48	0,72	0,58	0,93

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpul conjugat din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (17).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (18).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și PC5,5 emite lumină la 575 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de PC5,5 la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -PC5,5.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

**CYTO-STAT/COULTER
CLONE CD8-ECD
IOTest CD8-PC7**

REF 737659 – 50 tests

REF 737661 – 100 tests

PN 737683-CG



	CD8-ECD	CD8-PC7
Specificity	CD8	CD8
Clone	SFC121Thy2D3 ^{5,6,22,23}	SFC121Thy2D3 ^{5,6,22,23}
Hybridoma	NS/1-AG4 x BALB/c	NS/1-AG4 x BALB/c
Immunogen	Human thymocytes	Human thymocytes
Ig Chain	IgG1 ²³	IgG1 ²³
Species	Mouse	Mouse
Source	Conditioned Media	Conditioned Media
Purification	Affinity chromatography	Affinity chromatography
Fluorescence	Excites at 486-580 nm / Emits at 610-635 nm	Excites at 486-580 nm / Emits at 710-800 nm
Conjugation	ECD (Phycoerythrin-Texas Red-X)	PC7 (Phycoerythrin-Cy7)
Molar Ratio	ECD/Protein 0.5-1.5	PC7/Protein 0.5-1.5
Scatter Detection	Forward and/or side	Forward and/or side

MONOCLONAL ANTIBODY

NOT FOR DISTRIBUTION IN THE U.S.A. OR CANADA

For In Vitro Diagnostic Use

Rx Only in the U.S.A.

INTENDED USE

CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD (CD8) or IOTest CD8-PC7¹ is a fluorescent murine monoclonal antibody reagent used to identify and enumerate the percentage of CD8+ (suppressor/cytotoxic) lymphocytes in whole blood by flow cytometry.

SUMMARY AND EXPLANATION

The lymphocyte population of human peripheral blood is composed of three cell types - T (thymus-derived), B (bone marrow-derived), and null cells. These cell types are morphologically indistinguishable by microscopy but can be identified by characteristic antigenic differences in their cell membranes.

Two main types of T lymphocytes can be distinguished according to their function and surface proteins. These are the inducer (CD4+) and suppressor/cytotoxic (CD8+) T lymphocytes.^{2,3}

CD8

The CD8 antigen has a molecular weight of 76 kd.^{1,4} It is normally present on a majority of thymocytes (approximately 80%)⁵ and approximately 30-35% of peripheral blood T lymphocytes.^{4,5} The CD8+ lymphocytes play a central role in regulating the immune response through suppressor and cytotoxic action.^{2,3,6} The CD8 antigen reacts with the class I major histocompatibility complex (MHC) antigen on target cells.⁴

CLINICAL RELEVANCE

CD8

Identification of abnormal levels of CD8+ lymphocytes may aid in the diagnosis and/or prognosis of immunodeficiency diseases such as agammaglobulinemia, thymic aplasia (DiGeorge syndrome) and severe combined immunodeficiency.^{7,8} The finding that increased levels of CD8+ cells are associated with viral infections such as hepatitis B, Epstein-Barr, and cytomegalovirus may also be of diagnostic and/or prognostic significance.^{9,10}

CD4/CD8

Disease-related changes in CD4+ (CD4) and/or CD8+ (CD8) lymphocyte levels may alter CD4/CD8 inducer: suppressor/cytotoxic cell ratios. As a result, CD4/CD8 ratios may also be useful as diagnostic and/or prognostic indicators of immune competence.

CD4/CD8 ratios in conjunction with CD4+ lymphocyte cell numbers have been the most widely used laboratory parameters for the evaluation of AIDS-related complex

and AIDS.^{9,11} CD4/CD8 ratios fall toward zero in advanced AIDS patients with no detectable levels of CD4+ lymphocytes.⁹ In such cases, CD8+ lymphocyte levels may be normal, increased, or decreased.

Modulations in CD4/CD8 ratios and CD4+ and CD8+ lymphocyte levels may occur in autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS) and systemic lupus erythematosus (SLE). Increased CD4/CD8 ratios and decreased numbers of CD4+ and CD8+ lymphocytes have been observed in patients with progressive (active) MS.¹²⁻¹⁴ The lymphocyte response pattern in SLE, however, appears to reflect clinical disease activity and the level of organ involvement in the SLE disease process.¹⁵⁻¹⁹ To illustrate, high CD4/CD8 ratios and elevated CD4+ lymphocyte percentages have been found in active/inactive SLE patients with multi-system disease including lymphadenopathy but little or no renal disease.^{15,16} High CD4/CD8 ratios but decreased percentages of CD8+ lymphocytes have also been documented in similar active SLE patients.¹⁷ Further, high CD4+ and low CD8+ lymphocyte percentages have been measured in active SLE patients with central nervous system disease but no renal disease.¹⁸ In contrast, low CD4/CD8 ratios and decreased CD4+ lymphocyte percentages have been noted in active/inactive patients with SLE manifested by severe renal disease and/or thrombocytopenia.^{15,16} In other active/inactive SLE patients, both low CD4+ and high CD8+ lymphocyte percentages have been recorded.¹⁹ Finally, normal CD4/CD8 ratios have been obtained in patients with widespread multi-system SLE which often includes the renal and central nervous systems.^{15,16}

High CD4/CD8 ratios have been found in patients with thymic aplasia.⁷

Decreased CD4+ and increased CD8+ lymphocyte percentages without significant changes in CD4/CD8 ratios have been observed in patients with stable renal allograft function after transplantation.²⁰

Low CD4/CD8 ratios and decreased percentages of CD4+ lymphocytes have been documented in patients during phenotypic reconstitution following purged autologous bone marrow transplantation.²¹

PRINCIPLES OF TEST

This test depends on the ability of a monoclonal antibody to bind to the surface of cells expressing discrete antigenic determinants. CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD or IOTest CD8-PC7 is a murine monoclonal antibody specific for a cell surface antigen. Specific cell staining is accomplished by incubating whole blood with the CYTO-STAT/COULTER CLONE or IOTest reagent. Red blood cells are lysed and the remaining white blood cells are analyzed by flow cytometry using lymphocyte gates only. The percentage of positively-stained lymphocytes is determined for each sample. A duplicate whole blood sample stained with CYTO-STAT/COULTER CLONE

MslgG1-ECD or IOTest IgG1-PC7 isotypic control is used to assess nonspecific background fluorescence. (Label of isotypic control must correspond to label of monoclonal antibody.)

REAGENTS

See table above.

REAGENT CONTENTS

The antibody concentration in the CYTO-STAT/COULTER CLONE is 0.5 µg/test. Contact Beckman Coulter Customer Service to obtain the antibody concentration in the IOTest reagent.

The final concentration of nonantibody reagents in the CYTO-STAT/COULTER CLONE in 0.5 mL (1 vial) and IOTest 1.0 mL (1 vial) antibodies is 0.2% BSA, 0.01 M potassium phosphate, 0.15 M NaCl, 0.1% Na₃, and stabilizers.

STATEMENT OF WARNINGS

Iodoacetamide <0.1%	
May produce an allergic reaction.	
SDS	Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs .

1. This reagent contains sodium azide. Sodium azide under acidic conditions yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Azide compounds should be flushed with running water while being discarded. These precautions are recommended to avoid deposits in metal piping in which explosive conditions can develop. If skin or eye contact occurs, wash excessively with water.
2. Do not use antibody beyond the expiration date on label.
3. Samples and all material coming in contact with them should be handled as if capable of transmitting infection, and disposed of with proper precautions.
4. Never pipet by mouth and avoid contact of samples with skin and mucous membranes.
5. Minimize exposure of reagents to bright light during storage or incubation.
6. Incubation or centrifuge times or temperatures other than those specified may give erroneous results.
7. Avoid microbial contamination of reagents or erroneous results may occur.
8. When acquiring without automated analysis and using FC 500 Flow Cytometry Systems with CXP Software ensure that "Events" is set to 100% in all dot plot displays.
9. Use Good Laboratory Practice (GLP) when handling reagent.
10. Review all histograms before reporting results.



REAGENT PREPARATION

None. The CYTO-STAT/COULTER CLONE and IOTest monoclonal antibody reagents are used directly from the vial with no dilution or centrifugation necessary. All reagents should be brought to 20-25°C prior to use.

STORAGE CONDITIONS

Unopened reagent is stable to the expiration date on the vial when stored at 2-8°C. Opened vials are stable for 90 days when stored at 2-8°C. Return reagent to 2-8°C immediately after use. Avoid freezing and exposure to light.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any change in the physical appearance of the reagents*, or any major variation in values obtained for control samples may indicate deterioration and the reagents should not be used.

*Normal Appearance of Reagents

ECD - labeled: Clear pink to red liquid
PC7 - labeled: Clear magenta to purple liquid

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

CAUTION: The stability of blood samples is quite variable. For optimal results, start the assay within 6 hours of venipuncture. Unstained, anticoagulated blood should remain at 20-25°C until processing is begun. Do not refrigerate.

Collect a venous blood sample aseptically by venipuncture into a blood collection tube using an appropriate anticoagulant (EDTA is recommended). For detailed information on the collection of whole blood by venipuncture and interfering conditions, refer to "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3), Approved Edition" published by the Clinical and Laboratory Standards Institute. For each test, 100 µL of whole blood is required. Collect a sufficient amount of blood (1 to 2 mL required per tube) to run the test, control and have autologous plasma for sample dilution, if necessary. A white blood cell count should be performed.

PROCEDURE FOR IMMUNOFLUORESCENCE CELL SURFACE STAINING WITH CYTO-STAT/COULTER CLONE OR IOTEST MONOCLONAL ANTIBODY

MATERIAL SUPPLIED

CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD
Monoclonal Antibody,
REF 737659 - 50 tests (0.5 mL)
OR
IOTest CD8-PC7 Monoclonal Antibody,
REF 737661 - 100 tests (1.0 mL)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Erythrocyte Lytic Reagent (as appropriate):
COULTER IMMUNOPREP Reagent System for
COULTER Q-PREP Workstation,
PN 7546946 - 100 tests
Diluent (if necessary) Autologous plasma
OR
COULTER IMMUNOPREP Reagent System for
COULTER MULTI-Q-PREP or TQ-Prep Workstation,
PN 7546999 - 300 tests
Diluent (if necessary) Autologous plasma
Flow-Count Fluorospheres, PN 7547053
(Optional Reagent)
Isotypic Control MslgG1-ECD
OR

IOTest IgG1-PC7 Isotypic Control,
PN 737662
COULTER CYTO-TROL Control Cells,
PN 6604248
OR
IMMUNO-TROL Control Cells, PN 6607077
OR
IMMUNO-TROL Low Control Cells, PN 6607098
Phosphate Buffered Saline (PBS), PN 6603369
12 x 75 mm test tubes

Blood collection tube with anticoagulant
(EDTA is recommended)

Transfer pipets

Vortex mixer

Centrifuge

Flow cytometer (See Instrument Requirements section)

Cell counter or hemocytometer

Filters for EPICS XL/XL-MCL flow cytometer,
755 nm bandpass, PN 3814358, and 500 nm laser
blocking filter, PN 3814357, to collect PC7 fluorescence

INSTRUMENT REQUIREMENTS

Flow cytometer that provides excitation and measures emission of scatter and fluorescence as specified in the table on page 1 as applicable for your specific product. Users should refer to the manufacturer's instrument manuals for specific instructions for setting PMT voltages and fluorescence compensation prior to analysis.

PROCEDURE

1. Optimal staining is achieved with white blood cell counts in the range of 3-10 x 10³ cells/µL. White blood cell counts exceeding 10 x 10³ cells/µL require dilution, and white blood cell counts below 3 x 10³ cells/µL require centrifugation and resuspension, to achieve counts in the range of 3-10 x 10³ cells/µL. Autologous plasma is the recommended diluent when using the COULTER IMMUNOPREP Reagent System.

Abnormal Samples

- a. High White Blood Cell Count (>10 x 10³ cells/µL) should be diluted to achieve counts in the range of 3-10 x 10³ cells/µL.
 - b. Low White Blood Cell Count (<3 x 10³ cells/µL) - Buffy Coat Procedure
 - 1) Centrifuge blood at 20-25°C at 500 x g for 5 minutes.
 - 2) Draw off buffy coat with a Pasteur pipet, collecting some red blood cells and some plasma to assure that all white blood cells are recovered.
 - 3) Completely resuspend cells by mixing several times with a Pasteur pipet.
 - 4) Determine cell concentration using a cell counter or hemocytometer.
 - 5) Adjust cell concentration to 10 x 10³ cells/µL with diluent. Add 100 µL to antibody and follow standard procedure.
2. The appropriate isotype control should be run with each sample. For each sample, label two 12 x 75 mm test tubes, one for the monoclonal antibody and the other for the isotype control. Add 100 µL of the venous blood sample to each test tube. Care must be taken to avoid contamination of the tops and sides of the test tubes with blood or incomplete lysis may occur.
 3. Add 10 µL of the CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD reagent to the labeled tubes. Alternatively, add 10 µL of the IOTest CD8-PC7 reagent or IOTest IgG1-PC7 isotypic control to the labeled test tubes.
 4. Vortex gently. Incubate the reaction mixtures at 20-25°C for 10-12 minutes if using the COULTER IMMUNOPREP Reagent System.

IMPORTANT: If blood droplets remain around the top of the test tube they must be removed or nonlysed red blood cells may contaminate the final sample and skew the results. A cotton tip applicator may be used for removal.

5. Lyse the red blood cells in each test tube using the procedure recommended for the lysing method selected (COULTER IMMUNOPREP Reagent System with the COULTER Q-PREP, MULTI-Q-PREP or TQ-Prep Workstation). The CD8-ECD sample is ready for flow cytometry analysis. Continue below for CD8-PC7 preparation.

Continued Preparation for CD8-PC7

6. Centrifuge samples at 400 x g for 4 minutes at room temperature.
7. Aspirate or decant supernatant and vortex.
8. Resuspend cell pellet by adding 1 mL of PBS.

Flow Cytometry Analysis

CAUTION: If the laser on the flow cytometer is misaligned or the gates improperly set, results may be erroneous.

Analyze cells on a flow cytometer properly standardized and gated on lymphocytes according to the instrument manual.

QUALITY CONTROL PROCEDURE

COULTER CYTO-TROL Control Cells (PN 6604248), IMMUNO-TROL Control Cells (PN 6607077), or IMMUNO-TROL Low Control Cells (PN 6607098) should be used as a positive control material to ensure proper working conditions. Alternatively, a normal, apparently healthy donor may be run as a positive control to ensure proper working conditions. Normal ranges should be established within a local population of normal donors.

Specific and/or nonspecific antibody Fc binding to monocytes and granulocytes in a sample can be excluded by proper gating on lymphocytes on the flow cytometer.

An appropriate CYTO-STAT/COULTER CLONE isotypic control is used to negate nonspecific antibody Fc binding to lymphocytes in each sample. The brightly fluorescent positively-stained lymphocyte population is measured in gates set to exclude the low level of nonspecific fluorescence.

Nonspecific fluorescence above the background (when cursor is set to gate out 98 ± 1% nonspecific staining) is usually limited to 1-2% in normal individuals. Higher values may be seen in some neoplastic diseases. If the background level above the cursor for any control sample is greater than 1-2%, test results may be erroneous.

LIMITATIONS

1. For optimal results, blood samples should be stained within 6 hours of collection. Retain samples in blood collection tubes at room temperature prior to staining and analyzing. Do not refrigerate. Stored or refrigerated samples may give aberrant results. To ensure maximum viability, analyze stained cells promptly.
2. Certain patients may present special problems due to altered or very low numbers of certain cellular populations.
3. These reagents should not be diluted, aliquoted, or frozen. Use only as packaged.
4. These reagents are for flow cytometry use only.
5. These reagents are designed for use with whole blood preparations. They are not recommended for use with fresh or frozen mononuclear cell preparations.
6. Abnormal states of health are not always represented by abnormal percentages of certain leukocyte populations. An individual in an abnormal state of health may show the same leukocyte percentages as



a healthy person. Use test results in conjunction with clinical and other diagnostic data.

7. All red blood cells may not lyse under the following conditions: nucleated red blood cells, abnormal protein concentration or hemoglobinopathies. This may cause falsely decreased results due to unlysed red blood cells being counted as leukocytes.
8. Prolonged exposure of cells to lytic reagents may cause white blood cell destruction.
9. Results obtained with flow cytometry may be erroneous if the laser is misaligned or the gates are improperly set.
1. Due to an unacceptable variance among the different laboratory methods for determining absolute lymphocyte counts, an assessment of the accuracy of the method used is necessary.²⁴

EXPECTED VALUES

Blood samples were collected from a population of apparently healthy males and females. This population included adults from a variety of races ranging in age. Samples were stained with CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD or IOTest CD8-PC7 monoclonal antibody. Normal CD8+ cell values determined by flow cytometry (COULTER EPICS XL-MCL gated on lymphocytes) for whole blood are given in the following table. These are intended as representative values only. Each laboratory should establish its own expected values from the local population of normal donors.

WHOLE BLOOD

	n	Min	Max	Mean ±1 SD
CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD %CD8+ Lymphocytes	20	18	41	28.9 ±6.9
IOTest CD8-PC7 %CD8+ Lymphocytes	15	18	48	33.7 ±8.3

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SPECIFICITY

The SFC121Thy2D3 (CD8) monoclonal binds to a nonpolymorphic domain of the MHC Class I molecules. SFC121Thy2D3 (CD8) was assigned to CD8 during the 1st HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens.¹⁴

LINEARITY

To test the linearity of staining for CD8-ECD and CD8-PC7, a positive control cell (CYTO-TROL Control Cells) was concentrated. The appropriate range of CD8-ECD positive cells, 7 to 7,100 cells, and the percent CD8+ cells were measured over this range. The appropriate range of CD8-PC7 positive cells, 9 to 9,123 cells, and the percent CD8+ cells were measured over this range. Aliquots were stained and the linear regression between the expected values and the observed values was calculated. The parameters of the equation of the linear regression may be used to determine the linearity as well as the range of measurement.

Specificity	Linear regression	Linearity (R ²)	CD8 Cells (Range Tested x10 ³)
CD8-ECD	Y=1.0016x + 22.5	0.9998	0.007 - 7.1
CD8-PC7	Y = 0.9965x + 1.12	0.9999	0.009 - 9.1

PRECISION

Within Run (Intralaboratory) CD8-ECD and CD8-PC7

On the same day and using the same flow cytometer, 10 measurements of the percentage of staining of a positive target (peripheral blood lymphocytes) were carried out. The results obtained are summarized in the following table:

Level	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD8-ECD Lymphocytes	10	28	1.0	3.5
CD8-PC7 Lymphocytes	10	26	0.7	2.6

Interlaboratory CD8-ECD and CD8-PC7

On the same day and for the same positive target (peripheral blood lymphocytes), 10 measurements of the percentage of stained cells were carried out by two technicians and the preparations analyzed using two different cytometers. The results obtained are summarized in the following tables:

CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD

Lab/Instrument	n	CD8+	Mean % ±1 SD	%CV
1 XL-MCL	10	28	1.0	3.5
2 XL-MCL	10	28	1.0	3.7

IOTest CD8-PC7

Lab/Instrument	n	CD8+	Mean % ±1 SD	%CV
1 XL-MCL	10	26	0.7	2.6
2 XL-MCL	10	27	0.5	1.9

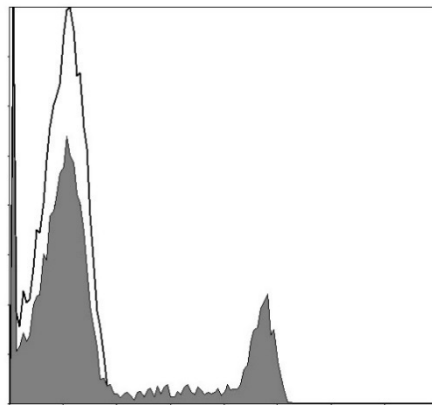
EXAMPLES

The graphs below are monoparametric representations (Count vs Fluorescence intensity) of a lysed normal whole blood sample.

Staining below is with IOTest CD8-PC7 Conjugated Antibody (PN 737661). Gate is on lymphocytes. A mouse PC7-conjugated IgG1 isotypic control (PN 737662) is shown.

Acquisition and analysis for CD8-PC7 are performed with a Cytomics FC 500 flow cytometer.

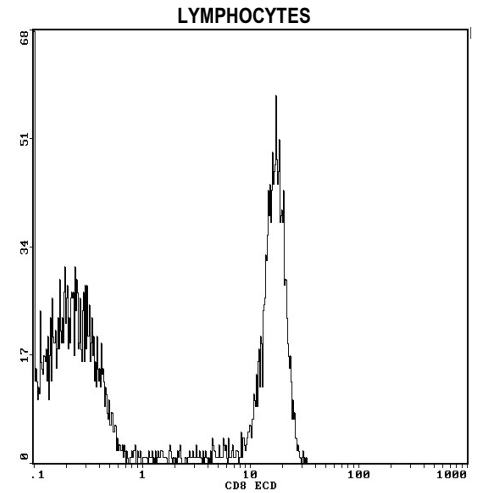
LYMPHOCYTES



CD8-PC7

Staining below is with CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD Conjugated Monoclonal Antibody (PN 737659). Gate is on lymphocytes. A mouse ECD-conjugated IgG1 isotypic control may be used but is not shown.

Acquisition and analysis for CD8-ECD are performed with a COULTER EPICS XL-MCL flow cytometer.



SELECTED REFERENCES

1. McMichael, A.J., ed.: Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens: 1987. Oxford: Oxford University Press, p. 202, 206.
2. Morimoto, C., Letvin, N.L., Distaso, J.A., Aldrich, W.R., and Schlossman, S.F.: 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J. Immunol.* 134: 1508-1515.
3. Morimoto, C., Letvin, N.L., Distaso, J.A., Brown, H.M., and Schlossman, S.F.: 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. *Eur. J. Immunol.* 16: 198-204.
4. Reinherz, E.L., Meuer, S.C., and Schlossman, S.F.: 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunol. Today* 4: 5-8.
5. Reinherz, E.L., Hussey, R.E., Fitzgerald, K., Snow, P., Terhorst, C., and Schlossman, S.F.: 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. *Nature* 294: 168-170.
6. Meuer, S.C., Schlossman, S.F., and Reinherz, E.L.: 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4395-4399.
7. Reinherz, E.L., Cooper, M.D., and Schlossman, S.F.: 1981. Abnormalities of T cell maturation and regulation in human beings with immunodeficiency disorders. *J. Clin. Invest.* 68: 699-705.
8. Schmidt, R.E.: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut* 59: 200-206.
9. de Martini, R.M. and Parker, J.W.: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. *J. Clin. Lab. Anal.* 3: 56-70.
10. Collier, A.C., Meyers, J.D., Corey, L., Murphy, V.L., Roberts, P.L., and Handsfield, H.H.: 1987. Cytomegalovirus infection in homosexual men. Relationship to sexual practices, antibody to human immunodeficiency virus, and cell-mediated immunity. *Am. J. Med.* 82: 593-601.
11. Taylor, J.M.G., Fahey, J.L., Detels, R., and Giorgi, J.V.: 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: Which to choose and how to use. *J. AIDS* 2: 114-124.
12. Morimoto, C., Hafner, D.A., Weiner, H.L., Letvin, N.L., Hagan, M., Daley, J., and Schlossman, S.F.: 1987. Selective loss of the suppressor-inducer T-cell subset in progressive multiple sclerosis. Analysis with anti-2H4 monoclonal antibody. *N. Engl. J. Med.* 316: 67-72.
13. Reinherz, E.L., Weiner, H.L., Hauser, S.L., Cohen, J.A., Distaso, J.A., and Schlossman, S.F.: 1980. Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis. Analysis with monoclonal antibodies. *N. Engl. J. Med.* 303: 125-129.
14. Weiner, H.L., Hafner, D.A., Fallis, R.J., Johnson, D., Ault, K.A., and Hauser, S.L.: 1984. Altered blood T-cell




- subsets in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 6: 115-121.
15. Smolen, J.S., Chused, T.M., Leiserson, W.M., Reeves, J.P., Alling, D., and Steinberg, A.D.: 1982. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 727: 783-790.
 16. Smolen, J.S., Morimoto, C., Steinberg, A.D., Wolf, A., Schlossman, S.F., Steinberg, R.T., Penner, E., Reinherz, E.L., Reichlin, M., and Chused, T.M.: 1985. Systemic lupus erythematosus: delineation of subpopulations by clinical, serologic and T cell subset analysis. *Am. J. Med. Sci.* 289: 139-147.
 17. Morimoto, C., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., Shur, P.H., Mills, J.A., and Steinberg, S.D.: 1980. Alterations in immunoregulatory T cell subsets in active systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 66: 1171-1174.
 18. Raziuddin, S., Nur, M.A., and Alwabel, A.A.: 1989. Selective loss of the CD4+ inducers of suppressor T cell subsets (2H4+) in active systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 16: 1315-1319.
 19. Sato, K., Miyasaka, N., Yamaoka, K., Okuda, M., Yata, J., and Nishioka, K.: 1987. Quantitative defect of CD4+2H4+ cells in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 30: 1407-1411.
 20. Ramos, E.L., Turka, L.A., Leggat, J.E., Wood, I.G., Milford, E.L., and Carpenter, C.B.: 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. *Transplantation* 47: 465-471.
 21. Pedrazzini, A., Freedman, A.S., Andersen, J., Heflin, L., Anderson, K., Takvorian, T., Canellos, G.P., Whitman, J., Coral, F., Ritz, J., and Nadler, L.M.: 1989. Anti-B-cell monoclonal antibody-purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. *Blood* 74: 2203-2211.
 22. Reinherz, EL, Kung, PC, Goldstein, G and Schlossman, SF: 1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. *J Immunol* 123: 1312 -1317.
 23. Reinherz, E.L., Haynes, B.F., Nadler, L.M., and Bernstein, I.D., eds.: *Leukocyte Typing II, Human T Lymphocytes*: 1986. New York: Springer-Verlag, p. 8-9.
 24. Koepke, J.A. and Landay, A.L.: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. *Clin Immunol Immunopathol.* 52:19-27.


PRODUCT AVAILABILITY

CYTO-STAT/COULTER CLONE CD8-ECD

Monoclonal Antibody

 737659 - 50 tests (0.5 mL)

IOtest CD8-PC7 Monoclonal Antibody

 737661 - 100 tests (1.0 mL)

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

For additional information, or if damaged product is received, call Beckman Coulter Customer Service at 800-742-2345 (USA or Canada) or contact your local Beckman Coulter Representative.

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (PN C05838).



Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com



Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision History

Revision CE, 06/2016

Changes were made to:

- Add new languages
- Update of EC Rep Address
- STATEMENT OF WARNINGS

Revision CF, 09/2017

Changes were made to:

- Add new languages

Revision CG, 10/2018

Changes were made to:

- Add new languages



	Specificații
Specificitate	CD10
Clonă	ALB1
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Human Leukemia cells
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
Raport molar	APC-AlexaFluor700/Ig: 0,5-1,5
Excitare λ	633/638 nm
Vârful de emisie	720 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD10-APC -Alexa Fluor 700

REF B49223 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD10 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Antigenul CD10, care mai este numit și neprilisin, este o metaloendopeptidază cu suprafața celulei de 100 kD care inactivează o varietate de peptide active din punct de vedere biologic. Identificată inițial ca antigen comun an leucemiei limfoblastice acute (CALLA) și considerat a fi specific tumorii, antigenul CD10 se regăsește la suprafața unei largi varietăți de celule normale și neoplastice (1; 2). CD10 se găsește în celulele cu leucemie limfoidă acută (ALL) care derivă din limfocite pre-B, iar prezența sa este raportată în celule de limfoblastic, în limfoamele Burkitt și foliculare, la suprafața celulelor progenitoare normale limfoide timpurii, în celule B imature din măduva osoasă la adulți și în celule B din centrul germinal din țesutul limfoid (3; 4).

CD10 în combinație cu prezența ICOS permite diferențierea între limfomul angioimunoblastic al celulelor T (AITL) de alte limfoame ale celulelor T (CD10-) (5, 6). De asemenea, CD10 poate ajuta la diferențierea între limfomul Burkitt (BL) și limfomul difuz cu celule B mari CD10+ (DLBCL) (7, 8). Pe lângă limfomul angioimunoblastic al celulelor T, cel Burkitt și cel difuz cu celule B mari, și alte limfoame pot fi CD10+, cum ar fi cel al celulelor de mantă (9), al zonei marginale (10) și limfoame rare CD5+ CD10+ (11).

Evaluarea prezenței CD10 folosind citometria de flux cu parametri multipli și analiză cluster este extrem de sensibilă și specifică pentru diagnosticarea limfomului folicular în particular, atunci când nu există țesut adecvat disponibil pentru diagnostic definitiv (12). CD10 este de obicei negativ în bolile limfoproliferative AML, CLL, EBV+, limfoplasmaticite, celule de mantă și zonă marginală. O prezență CD10 clară, asociată cu Bcl-2 clar, poate reprezenta o colonizare a limfomului folicular și prin urmare se recomandă etapizarea tumorii (13).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS

Fișa tehnică de securitate este disponibilă la
beckman.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 µl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotopic: APC-AlexaFluor700reactiv IOTest (REF A79391)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalysse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotopic (REF A79391)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 µl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 µl de ser de control izotopic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 µl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 µl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Gena CALLA include o glicoproteină transmembranară de tip II cu 100 kD. Secvențele de ADN legate de CALLA se găsesc în cromozomul uman 3J (14). CALLA (CD10) a fost descrisă ca o enzimă de suprafață care se regăsește în progenitorii limfoizi timpurii și în neutrofile; ea a fost identificată drept metaloprotează de zinc, endopeptidază neutră 24.11 (NEP, „enkefalinază”). Despre enzima CD10 se cunoaște că hidrolizează o varietate de peptide active biologic, inclusiv met-enkefalină, formil-met-leu-phe (f-MLP) și substanța P, care sunt implicate în procesul de diferențiere și maturare celulară.

Anticorpul monoclonal ALB1 a fost studiat la 1st HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Primul congres HLDA consacrat antigenilor de diferențiere a leucocitelor umane), organizat la Paris, în Franța, în 1982 (15).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (16). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Granulocite + CD10-APC-A700	4,0 cells/ μ l

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2
Granulocite + CD10-APC-A700	10	98,52	99,70	0,24	0,04	0,24	0,04

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (17).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (18).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și APC-AlexaFluor700 emite lumină la 660 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de APC-AlexaFluor700 la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -APC-AlexaFluor700.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Alexa Fluor este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD11c
Clonă	BU15
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Dendritic cells from synovial fluid
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
Raport molar	PC7/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	770 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD11c-PC7

REF B96763 100 de teste; 1 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD11c prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porțiilor (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Analiza prezenței antigenului CD11c este utilă pentru identificarea și caracterizarea afecțiunilor hematologice (1,2,3,4). CD11c este util în diagnoza leucemiilor cu celule păroase, a anumitor leucemii ale celulelor B și în anumite limfoame non-Hodgkin (2,4).

Este utilizat în fenotiparea subseturi de celule dendritice din sângele din circulație, așa cum este exemplificat într-un studiu consacrat pacienților cu leucemii mieloidă (5).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: PC7reactiv IOTest (REF 737662)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalys

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF 737662)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Antigenul CD11c (subunitatea integrină alphaX/antigen p150 la suprafața leucocitelor) face parte din familia integrinei. Asemenea altor integrine din leucocite (CD11a, CD11b, CD11d), CD11c este asociat necovalent cu subunitatea integrină beta2 (CD18) (6,7).

CD11c este prezent în principal în monocite, macrofage și în celule NK (Natural Killer) și, într-o măsură mai mare, în granulocite, celule dendritice și anumite subpopulații de limfocite T și B (8,9).

mAb BU15 a fost atribuit CD11c în cursul 3rd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al 3-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor), organizat la Oxford, Anglia, în 1986 (cod WS: 256, secțiunea M) (10).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (11). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Lymphocytes CD11c-PC7+	11 cells/ μ L
Monocytes CD11c-PC7+	1 cell/ μ L
Granulocytes CD11c-PC7+	5 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Lymphocytes CD11c-PC7+	10	30,65	19,48	0,44	0,47	1,43	2,44
Monocytes CD11c-PC7+	10	99,24	98,16	0,42	0,97	0,42	0,98
Granulocytes CD11c-PC7+	10	99,96	99,97	0,02	0,01	0,02	0,01

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (12).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (13).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și PC7 emite lumină la 575 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de PC7 la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -PC7.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD14
Clonă	RM052
Hibridom	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Isolated human monocytes
Imunoglobulină	IgG2a
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
Raport molar	APC-AlexaFluor750/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	633/638 nm
Vârful de emisie	775 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD14-APC -Alexa Fluor 750

REF B92421 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD14 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOTest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Antigenul CD14 este puternic exprimat pe monocite și moderat exprimat pe neutrofile, subpopulația de celule dendritice și macrofage. CD14 este un marker util pentru imunofenotiparea leucemiei mieloide acute (AML). Analiza simultană a expresiei antigenelor CD14 și CD13 ajută la diferențierea AML-urilor M4 (1) cu antigenitate monocitară (CD14 + CD13 + fenotip) de la AML-uri M2 cu oncogenitate non-monocitară (CD14-CD13 + fenotip) (2; 3; 4; 5).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalyse

1. În fiecare eprubetă, adăugați volumul adecvat 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în fiecare eprubetă. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Molecula CD14 este o proteină cu greutatea moleculară de 53–55 kDa ancorată în membrană prin intermediul unui grup glicosilfosfatidilinositol (GPI) (6). Antigenul CD14 este puternic exprimat pe monocite și macrofage și moderat exprimat pe neutrofile polinucleare din sângele periferic; este, de asemenea, prezent pe fagocitele pleurale și celule reticulare dendritice. CD14 se găsește pe celule ale liniei mielomonocitare și este foarte slab exprimat de limfocitele B. CD14 este absent din limfocitele T, precum și din celule NK, eritrocite și trombocite (7).

Anticorpus monoclonal RM052 a fost asociat cu CD14 la 6th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al 6-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor), organizat la Kobe (Japonia) în 1996 (cod WS: MA62, secțiunea M) (5).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (8). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Monocytes CD14-APC-A750+	1,0 cell/ μ L
Granulocytes CD14-APC-A750+	1,0 cell/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Monocytes CD14-APC-A750+	10	91,10	94,90	1,10	0,66	1,20	0,70
Granulocytes CD14-APC-A750+	10	99,87	99,75	0,03	0,04	0,03	0,04

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (9).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (10).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și APC-AlexaFluor750 emite lumină la 660 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de APC-AlexaFluor750 la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -APC-AlexaFluor750.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Alexa Fluor este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD15
Clonă	80H5
Hibridom	MOPC 315-43 x balb/c
Imunogen	Human granulocytes
Imunoglobulină	IgM
Specie	Șoarece
Purificare	filtrare pe gel
Fluorocrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Raport molar	FITC/Ig: 12-14
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	525 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest CD15-FITC

REF B36298 100 de teste; 2 ml, 20 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea și enumerarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD15 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOTest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Antigenul CD15 este valoros pentru identificarea și caracterizarea diferitelor tulburări hematopoietice (1). Detectarea antigenului CD15 poate fi utilă în mai multe stadii ale bolii. S-a dovedit a fi un indicator-cheie pentru monitorizarea evoluției bolii în sindroame mielodisplastice, permițând determinarea maturității mieloblastelor (2). Antigenul CD15 este un instrument de diagnosticare și prognosticare pentru leucemiile mieloid acute (3) și este exprimat la majoritatea pacienților cu leucemie mielogenoasă cronică (4, 5). Antigenul CD15 este, de asemenea, markerul de filiație recomandat pentru identificarea neutrofilelor în diagnosticarea HPN (6).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckmancoulter.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Probele trebuie păstrate la temperatura camerei (18–25°C) și nu trebuie agitate. Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 20, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: FITCreactiv IOTest (REF A07795)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalyse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A07795)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 20 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 20 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Antigenul CD15 (Lewis x/Lex) este molecula de lacto-N-(neo)-fucopentoză III. Acest epitop carbohidrat este purtat de ambele glicolipide și glicoproteine exprimate pe membrana celulară. Antigenul CD15 este puternic exprimat de neutrofile, eozinofile, monocite și celule precursorale mieloidale normale. Nu este exprimat pe eritrocite normale, trombocite și limfocite. Anticorpus monoclonal 80H5 recunoaște un epitop de diferențiere mieloidă timpurie care se găsește pe metamielocite, mielocite, promielocite și macrofage activate. De asemenea, reacționează cu granulocite. Anticorpus monoclonal 80H5 a fost atribuit clusterului CD15 de diferențiere cu ocazia

Fifth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al cincilea grup de lucru internațional privind antigenele de diferențiere a leucocitelor umane), organizat la Boston, SUA, în 1993 (7, 8).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (9). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analiz care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Monocite + CD15-FITC	2,0 Cells/ μ L
Granulocite + CD15-FITC	2,0 Cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Monocite + CD15-FITC	10	99,76	98,91	0,18	0,34	0,18	0,35
Granulocite + CD15-FITC	10	99,98	99,95	0,01	0,06	0,01	0,06

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpul conjugat din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (10).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (11).
7. Anticorpul monoclonal, ai izotipului IgM, ai antigenului Lewis x, precum 80H5 (CD15) sunt cunoscuți ca inductori ai agregării celulelor de origine mielomonocitică (12). Aceste tipuri de agregate pot fi excluse din porțile de interes și pot induce estimări inexacte ale celulelor pozitive CD15.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD16
Clonă	3G8
Hibridom	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Human neutrophils
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Pacific Blue
Raport molar	Pacific Blue/Ig: 6,50-7,80
Excitare λ	405 nm
Vârful de emisie	455 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD16-Pacific Blue

REF B36292 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD16 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porțiilor (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

În afecțiunile maligne hematopoietice, prezența CD16 la un anumit tip de leucemie pare a avea o valoare de prognoză (1,2). O populație definită drept celule T CD16+ de tip NK pare utilă pentru a determina activitatea bolii, în anumite tipuri de CLL (3). Mai important, studii clinice recente au indicat semnarea CD16 ca un candidat potențial pentru desemnarea imunoterapiei noi bazate pe celule împotriva leucemiei celulelor B și împotriva AML (4,5).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: Pacific Bluereactiv IOTest (REF A74764)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalys

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A74764)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Antigenul CD16 este receptorul cu afinitate scăzută pentru IgG (FcγRIII) care leagă complexe imunitare, dar nu și IgG-ul monomeric. Antigenul CD16 există în două forme diferite codate de două gene diferite: FcγRIIIA (sau III-2) și FcγRIIIB (sau III-1). Eterogenitatea genetică a CD16 generează molecule alternative ancorate în membrană. Una este forma transmembranară (FcγRIIIA, 50–65 kDa) prezentă în celule NK, monocite și macrofage. Cealaltă este o formă ancorată în glicozilfosfatidilinozitol (GPI) (FcγRIIIB, 48 kDa), care este prezentă numai în neutrofile (6,7).

S-a demonstrat că antigenul CD16 poate fi asociat non-covalent în membrana celulelor NK, în lanțul CD3ζ de 16 kDa (8) sau în lanțul dimeric FcRγ (9). Anticorpul monoclonal 3G8 (mAb) se leagă la FcγRIIIA, dar și la FcγRIIIB (puternic). S-a demonstrat că blochează complet legarea dimerilor IgG la FcγRIIIB (10). Experiment în cadrul cărora au fost realizate mutații de aminoacizi asupra moleculei FcγRIIIB au demonstrat faptul că 3G8 mAb este afectat de substituțiile Lys162 și Val164 în bucla FG a domeniului de tip Ig membrană-proximal al moleculei (11). 3G8 mAb a fost asociat cu CD16 în cursul fifth HLDA workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al cincilea congres internațional consacrat antigenilor de diferențiere din leucocitele umane), organizat la Boston, SUA, în 1993 (12).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (13). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Limfocite + CD16-Pacific Blue	4,0 Cells/ μ L
Granulocite + CD16-Pacific Blue	2,0 Cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Limfocite + CD16-Pacific Blue	10	8,54	9,86	0,23	0,41	2,72	4,20
Granulocite + CD16-Pacific Blue	10	94,97	99,04	1,74	0,11	1,83	0,12

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (14).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (15).

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Pacific Blue este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD19
Clonă	J3-119
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	SKLY18 Lymphoma cells
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
Raport molar	ECD/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	613 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD19-ECD

REF A07770 100 de teste; 1 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD19 prezent în probele biologice umane cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametri diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

Fluorescența celulelor delimitate se analizează pentru distingerea evenimentelor colorate pozitiv de cele necolorate. Rezultatele sunt exprimate ca procentaj de evenimente pozitive în raport cu toate evenimentele obținute de gating.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD19 este unul dintre markerii cei mai consecvenți pentru recunoașterea limfocitelor B și este reprezentat în majoritatea celulelor din linia limfocitelor B, de la cei mai timpurii precursori ai celulelor B (celulele pro-B) la plasmablastele diferențiate terminal și celulele de plasmă (1). CD19 este o glicoproteină transmembranară specifică liniei B, a cărei reprezentare se păstrează la peste 95% din bolile maligne ale celulelor B și limfocitoza monoclonală a celulelor B (2,3).

CD19 a fost selectat la WHO 2006 drept cel mai important marker imunofenotipic pentru determinarea selectivității descendenței liniare în proliferările de celule B (4). CD19 este prin urmare inclus într-un număr mare de teste pentru diagnosticarea bolilor hematologice limfoproliferative, inclusiv leucemia, limfomul non-Hodgkin al celulelor B și bolile de mielom multiplu (5,6,7,8,9).

Detecția clonală a celulelor B CD19 în CLL este un exemplu tipic de utilizare a citometriei în flux în diagnosticarea și monitorizarea bolii (10,11). Mai mult, detecția CD19 în conjuncție cu alți markeri și parametri celulari poate fi utilă pentru diferențierea bolii CLL stabile de cea progresivă (10). Multe progrese în traterea B-ALL pot fi atribuite selectivității detecției clonei B-ALL pe baza reprezentării stabile a antigenului CD19.

Mai mult, CD19 este un marker esențial pentru designul testelor de anticorpi CD pentru monitorizarea pacienților cu B-ALL pentru Boala reziduurilor minime (Minimal Residual Disease, MRD) (remisie/reparație și răspuns la tratament, inclusiv testarea medicamentelor noi) (12,13,14). CD19 a jucat un rol major în identificarea defectelor celulelor B în imunodeficiențele principale și secundare (15). Împreună cu alți markeri pentru celule B/T, CD19 a permis clasificarea și monitorizarea clinică pentru stabilirea nivelului de deficiențe ale celulelor B și a gradului de restituție funcțională a celulelor B după un transplant de măduvă(16).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS

Fișa tehnică de securitate este disponibilă la
beckman.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 µl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotopic ECD: reactiv IOTest (REF A07797)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURA CU REACTIVUL VERSALYSE

Observație: procedura de mai jos este valabilă pentru aplicații standard. Volumele de probe și/sau VersaLyse pentru anumite aplicații Beckman Coulter pot fi diferite. Într-un astfel de caz, urmați instrucțiunile din prospect tehnic al aplicației.

Pentru fiecare probă analizată, în afară de eprubeta de testare, este necesară o eprubetă de control în care celulele sunt amestecate în prezența serului de control izotopic (REF A07797).

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 µl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 µl de ser de control izotopic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 µl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină. În cazul în care proba nu conține celule roșii, se adaugă 2 ml de PBS.
5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml sau 1 ml de PBS plus 0,1% formaldehidă dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 ore. (O soluție PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținută prin diluarea unei cantități de 12,5 µl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml sau 1 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

VALORI PRECONIZATE

Fiecare laborator trebuie să alcătuiască o listă de valori de referință pe baza unui grup de donatori sănătoși din populația locală. Acest lucru trebuie realizat prin luarea în considerare a vârstei, sexului și grupului etnic, precum și a oricărei alte posibile diferențe regionale.

În laboratoarele noastre, probele de sânge integral de la 50 adulți sănătoși au fost tratate utilizându-se reactivul descris mai sus. Rezultatele obținute pentru numărul de evenimente pozitive de interes cu acest reactiv sunt date în tabelele de mai jos:

Limfocite	Număr	Medie (%)	Deviație standard	valoare limită (%)
CD19-ECD+	50	10,80	5,72	52,96

PERFORMANȚA

Datele de performanță se obțin folosindu-se procedeul descris mai sus pe probe de sânge vechi de 24 de ore recoltate anterior în eprubete sterile cu sare EDTA ca anticoagulant. Analiza se efectuează în decurs de 2 ore de la imunocolorare.

SPECIFICITATE

Clona J3-119 a fost asociată pentru prima dată cu CD19 în cursul celui de al 4-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor (4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens), Viena, 1989, (17). Antigenul uman CD19 este o glicoproteină transmembranară de 95 Kd care aparține superfamiliei imunoglobulinelor. CD19 este clasificat drept o proteină transmembranară de tip I, cu un singur domeniu transmembranar, un terminal C citoplasmic și un terminal N extracelular. CD19 este extrem de implicat în stabilirea pragurilor de semnalare celulară B intrinsece prin modularea atât a semnalării celulare B dependente de receptor, cât și a celei independente. CD19 funcționează ca o componentă dominantă de semnalare pentru un complex multimolecular la suprafața celulelor B mature.

REPRODUCTIBILITATE INTRALABORATOR

În aceeași zi și utilizându-se același citometru, au fost efectuate 12 măsurători ale procentajului de colorare a unei ținte pozitive. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)	Deviație standard	valoare limită (%)
Limfocite +CD19-ECD	12	11,21	0,77	6,9

Liniaritate

Pentru a testa liniaritatea colorării acestui reactiv, au fost mixate o linie pozitivă de celule (RAMOS) și o linie negativă de celule (HPBALL) în diverse proporții cu un număr final constant de celule astfel încât raportul dintre linia pozitivă și cea negativă de celule să fie cuprins între 0% și 100%.

Părțile alicote au fost colorate utilizându-se procedura descrisă mai sus și s-a calculat regresia liniară între valorile așteptate și valorile observate.

Specificitate	Regresie liniară	Liniaritate (R ²)
CD19-ECD	$Y = 0,98 X + 0,84$	0,999

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (18).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (19).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și ECD emite lumină la 575 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de ECD la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -ECD.

Consultați Anexa pentru exemple și referințe.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Texas Red-X este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD20
Clonă	B9E9 (HRC20)
Hibridom	X63 x balb/c
Imunogen	DAUDI Cell line (human B-lymphoblastoid)
Imunoglobulină	IgG2a
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
Raport molar	ECD/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	613 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD20-ECD

REF B92433 100 de teste; 1 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD20 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Antigenul CD20 este prezent în majoritatea celulelor din linia limfocitelor B, de la cele mai timpurii precursori de celule B (celule pro-B) până la plasmablaste și celule de plasmă diferențiate terminal (1). Molecula CD20, care nu este prezentă în celulele stem hematopoietice, este o proteină transmembranară care se consideră că funcționează drept canal pentru calciu și este implicată în activarea și proliferarea celulelor B (2).

Molecula CD20 este un marker util pentru identificarea anumitor sindroame limfoproliferative atunci când este utilizată într-un panou de imunofenotipare extins (3,4,5). Analiza simultană a antigenilor CD20 și CD10 împreună cu lanțurile kappa/lambdă CD45 CD10, CD5, CD38 permite identificarea rapidă și caracterizarea mării majorități de neoplazii ale celulelor B. Alți markeri utili sunt CD22, CD23, CD79b, CD27, IgD și CD34, (3,4,5,6). Prezența CD20 în celulele B este folosită pentru terapia monoclonală țintită în diferite afecțiuni maligne ale celulelor B (7).

Rituximab și alți reactivi anti-CD20 în combinație cu chimioterapia induc o remisie efectivă a numărului de limfoame, CLL-uri și alte afecțiuni maligne ale celulelor B (8,9,10,11,12). Imunoterapia anti-CD20 a fost utilizată eficient în condiții autoimune, inclusiv artrită reumatoidă, lupus eritematos sistemic (LSE) și purpura trombocitopenică imună (ITP) (13,14,15). Astfel, imuno-monitorizarea celulelor purtătoare de CD20 este un instrument util pentru diagnosticarea și managementul clinic al pacienților cu afecțiuni maligne hematopoietice și cu alte boli ale celulelor B.

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.

În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.

7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv VersaLyse

1. În fiecare eprubetă, adăugați volumul adecvat 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în fiecare eprubetă. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.
De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.
5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:
0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).
0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Clona B9E9 (HRC20) a fost asociată CD20 la 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al 5-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor), organizat la Boston, SUA, în 1993 (Cod WS: CD20.12, Secțiunea B) (16).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (17). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Lymphocytes CD20-ECD+	1,0 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2
Lymphocytes CD20-ECD+	10	14,03	13,02	1,33	0,57	9,50	4,40

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (18).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (19).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și ECD emite lumină la 575 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de ECD la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -ECD.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Texas Red-X este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD22
Clonă	SJ10.1H11
Hibridom	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Human NALM1 cell line
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Allophycocyanin (APC)
Raport molar	APC/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	633/638 nm
Vârful de emisie	660 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD22-APC

REF B96777 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD22 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Antigenul CD22 este detectat în citoplasmă precoce în timpul ontogenezei celulelor B (stadiul pro-B târziu), apare pe suprafața celulară simultan cu exprimarea IgD membranos și se găsește pe majoritatea limfocitelor B cele mai mature (1,2). Antigenul CD22 se pierde în timpul stadiilor terminale de diferențiere, înainte de stadiul de celule plasmactice (1). La sângele integral periferic, exprimarea antigenului CD22 este limitată la limfocitele B. Antigenul CD22 este util în fenotiparea majorității leucemiilor cu celule B și a aproape tuturor limfoamelor cu celule B în combinație cu alți markeri (3).

În plus, antigenul CD22, în asociere cu antigenul CD11c, reprezintă un marker unic pentru tratamentul leucemiei cu celule păroase (HCL), deși niciunul dintre antigene nu este specific pentru această boală (4, 5). Cazurile de HCL demonstrează un model unic histogramă de fluorescență pentru CD22+CD11c+, care se caracterizează printr-o fluorescență uniform intensă a antigenelor CD11c și CD22.

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.

În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.

7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: APCreactiv IOTest (REF IM2475)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv VersaLyse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF IM2475)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

CD22 este o moleculă transmembranară monocatenară de tipul I cu o masă moleculară de 130–140 kDa compusă din șapte domenii imunoglobulinice (Ig-like) (1). Datorită faptului că aceste domenii, parte a superfamiliei imunoglobulinelor (IgSF), prezintă proprietăți de proteine de legare a acidului sialic, molecula CD22 este un membru al familiei sialoadezinelor, precum CD33 și glicoproteina asociată mielinei (MAG) (6). Domeniul N-terminal, distal față de membrană, este un domeniu Ig de tipul V, iar celelalte șase domenii proximale față de membrană sunt domenii Ig de tipul C2 (6). Domeniul citoplasmatic al moleculei CD22 include șase tirozine care sunt posibile ținte pentru fosforilare. Unele regiuni ale capătului intracitoplasmatic prezintă omologie la motivele activatoare bazate pe tirozină (ITAM), iar altele omologie cu motivele inhibitoare bazate pe tirozină (ITIM) (6,7). Molecula CD22 apare asociată în mod constitutiv cu BCR (receptorul antigenic de celule B)

și acest lucru poate implica recunoașterea de către CD22 a determinantilor carbohidrați mIgM (8,9,10). CD22 mediază adeziunea interacțiunilor limfocitare B-B și a interacțiunilor dintre celule B și eritrocite sau leucocite (6,9,11,12).

Anticorpul monoclonal SJ10.1H11 a fost atribuit clusterului de diferențiere CD22 la Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (Al doilea grup de lucru internațional privind antigenele de diferențiere a leucocitelor umane), organizat la Boston (1984) (13).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (14). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Lymphocytes CD22-APC+	2 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Lymphocytes CD22-APC+	10	14,13	9,81	0,43	0,26	3,04	2,66

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpul conjugat din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (15).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (16).

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD23
Clonă	9P25
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	EBV transformed lymphoblastoid cell line
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Raport molar	FITC/Ig: 4 - 5,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	525 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest CD23-FITC

REF IM0529 100 de teste; 2 ml, 20 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea și enumerarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD23 prezent în probele biologice umane cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOTest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

Fluorescența celulelor delimitate se analizează pentru distingerea evenimentelor colorate pozitiv de cele necolorate. Rezultatele sunt exprimate ca procentaj de evenimente pozitive în raport cu toate evenimentele obținute de gating.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD23 este prezent în celule B activate mature în care este prezent IgM sau IgD, în monocite/macrofage activate, subseturi de celule T, plachete, eozinofile, celule Langerhans, celule foliculare dendritice (CD23, alături de CD21, CD35) și în epiteliumul intestinal (1, 2, 3). Din contră, absența CD23 din bazofile, celule B în repaus, limfoame ale celulelor B (limfomul lui Burkitt, limfoame tip Burkitt), limfom folicular, limfom de celule de mantă și limfom al zonei marginale reprezintă un fenotip distinct pentru diagnostic diferențiat. CD23 acționează ca factor de creștere și de activare pentru celulele B, promovând diferențierea în celulele plasmei. Molecula trunchiată poate fi secretată, funcționând în acest caz ca factor de creștere mitogenică potent (sCD23). Forma solubilă controlează și sinteza și homeostaza IgE în celulele B (4, 5). Forma membranară de CD23 regulează sinteza IgE prin legarea CD21 și IgE.

CD23 mediază numeroase răspunsuri imune legate de IgE (inclusiv focalizarea alergenilor) prin îmbunătățirea prezentării complexului de antigeni IgE, regularea sintezei IgE, influențarea diferențierii celulelor și creșterea celulelor B și T și stimularea producției de mediatori pro-inflamatori de către monocite/macrofage, eozinofile și chiar celule ale musculaturii netede. Utilizarea CD23 cu anticorp monoclonal (MAb) reprezintă o terapie promițătoare în bolile alergice (anti-CD23 MAb - Lumiliximab) (6). De obicei limfomul de celule de mantă (MCL) este negativ sau redus pozitiv la CD23, în timp ce limfoamele limfocitare cu limfocite mici/leucemia limfocitară cronică (SLL/CLL) sunt pozitive la CD23. Diferențierea între SLL/CLL și MCL are implicații clinice importante pentru prognoză și tratament, iar un MCL care prezintă CD23+ poate avea o prognoză mai bună (7,8,9).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckmancoulter.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Probele trebuie păstrate la temperatura camerei (18–25°C) și nu trebuie agitate. Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 20, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotopic FITC: reactiv IOTest (REF A07795)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURA CU REACTIVUL VERSALYSE

Observație: procedura de mai jos este valabilă pentru aplicații standard. Volumele de probe și/sau VersaLyse pentru anumite aplicații Beckman Coulter pot fi diferite. Într-un astfel de caz, urmați instrucțiunile din prospect tehnic al aplicației.

Pentru fiecare probă analizată, în afară de eprubeta de testare, este necesară o eprubetă de control în care celulele sunt amestecate în prezența serului de control izotopic (REF A07795).

1. În fiecare eprubetă, adăugați 20 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 20 μl de ser de control izotopic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină. În cazul în care proba nu conține celule roșii, se adaugă 2 ml de PBS.
5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml sau 1 ml de PBS plus 0,1% formaldehidă dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 ore. (O soluție PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținută prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml sau 1 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

VALORI PRECONIZATE

Fiecare laborator trebuie să alcătuiască o listă de valori de referință pe baza unui grup de donatori sănătoși din populația locală. Acest lucru trebuie realizat prin luarea în considerare a vârstei, sexului și grupului etnic, precum și a oricărei alte posibile diferențe regionale.

În laboratoarele noastre, probele de sânge integral de la 50 adulți sănătoși au fost tratate utilizându-se reactivul descris mai sus. Rezultatele obținute pentru numărul de evenimente pozitive de interes cu acest reactiv sunt date în tabelele de mai jos:

Limfocite	Număr	Medie (%)	Deviație standard	valoare limită (%)
CD23-FITC+	50	7,70	4,05	53,0

PERFORMANȚA

Datele de performanță se obțin folosindu-se procedeul descris mai sus pe probe de sânge vechi de 24 de ore recoltate anterior în eprubete sterile cu sare EDTA ca anticoagulant. Analiza se efectuează în decurs de 2 ore de la imunocolorare.

SPECIFICITATE

Antigenul CD23 este o glicoproteină transmembranară cu greutatea moleculară de 45 kDa, asociată spațial cu complexul major de histocompatibilitate (MHC) clasa II. Molecula CD23, denumită și FcγRIIb, este un receptor cu afinitate mică pentru IgE. Antigenul CD23 este prezent în principal în limfocite și monocite B, dar este prezent și într-o gamă largă de alte celule, cum ar fi limfocite T, eozinofile, plachete, celule Langerhans, un subset de celule și neutrofile epiteliale. La limfocitele B, prezența CD23 este regulată pozitiv la activare și în final se pierde la diferențiere în plasmocite secretoare. O formă solubilă de CD23 (sCD23) există și poate fi implicată (ca și CD23) în regularea sintezei IgE și a fenomenului inflamator (10, 11)

Anticorpul monoclonal 9P25 a fost atribuit CD23 în cursul 6th HLDA Workshop on Human Leucocytes Differentiation Antigens (Al șaselea congres HLDA consacrat antigenilor de diferențiere a leucocitelor umane), organizat la Kobe, Japonia, 1996 (cod WS: CD23.1, Secțiunea B) (12).

REPRODUCTIBILITATE INTRALABORATOR

În aceeași zi și utilizându-se același citometru, au fost efectuate 12 măsurători ale procentajului de colorare a unei ținte pozitive. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)	Deviație standard	valoare limită (%)
Limfocite +CD23-FITC	12	7,25	0,33	4,49

Liniaritate

Pentru a testa liniaritatea colorării acestui reactiv, au fost mixate o linie pozitivă de celule (RPMI8866) și o linie negativă de celule (FRN3.4.14) în diverse proporții cu un număr final constant de celule astfel încât raportul dintre linia pozitivă și cea negativă de celule să fie cuprins între 0% și 100%.

Părțile alicote au fost colorate utilizându-se procedura descrisă mai sus și s-a calculat regresia liniară între valorile așteptate și valorile observate.

Specificitate	Regresie liniară	Liniaritate (R ²)
CD23-FITC	$Y = 0,9936 X - 0,7529$	0,9997

LIMITĂRI

- Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
- Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
- Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
- Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
- În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (13).
- În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (14).
- În cazul anumitor donatori poate fi observată o colorare slabă, nespecifică, la nivelul monocitelor

Consultați Anexa pentru exemple și referințe.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

**IOTest
CD25-PC5**

REF IM2646
100 tests; 1 mL
10 µL / test



**IOTest
Conjugated Antibody**



ENGLISH	Specifications
Specificity	CD25
Clone	B1.49.9
Hybridoma	NS1 x balb/c
Immunogen	Alloactivated T lymphocytes
Immunoglobulin	IgG2a
Species	Mouse
Source	Ascites fluid or supernatant of in vitro cultured hybridoma cells
Purification	Affinity chromatography
Fluorochrom	R Phycoerythrin-Cyanine 5.1 (PC5)
Molar ratio	PC5 / Ig: 0.5 - 1.5
λ excitation	488 nm
Emission Peak	670 nm
Buffer	PBS pH 7.2 plus 2 mg / mL BSA and 0.1% NaN ₃

USE

This fluorochrome-conjugated antibody allows the identification and numeration of cell populations expressing the CD25 antigen present in human biological samples using flow cytometry.

PRINCIPLE

This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by leucocytes. Specific staining of the leucocytes is performed by incubating the sample with the IOTest reagent. The red cells are then removed by lysis and the leucocytes, which are unaffected by this process, are analyzed by flow cytometry. The flow cytometer measures light diffusion and the fluorescence of cells. It makes possible the delimitation of the population of interest within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the diffusion of narrow-angle light (Forward Scatter or FS). Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer can be used as supports in the gating stage depending on the application chosen by the user. The fluorescence of the delimited cells is analyzed in order to distinguish the positively-stained events from the unstained ones. The results are expressed as a percentage of positive events in relation to all the events acquired by the gating.

EXAMPLES OF CLINICAL APPLICATIONS

The CD25 antigen is generally defined as an activation and differentiation marker (1). Its analysis permits the characterization and numeration of CD25+ leucocyte populations (usually T lymphocytes) in immune system disorders (e.g. immune deficits, viral infections) (2). CD25 can be used for the follow-up of leucocyte populations in malignant blood dyscrasias (e.g. CD25+ in the case of hairy cell leukaemias) (3 - 5).

STORAGE AND STABILITY

The conjugated liquid forms must be kept at between 2 and 8°C and protected from light, before and after the vial has been opened. Stability of closed vial: see expiry date on vial. Stability of opened vial: the reagent is stable for 90 days.

REAGENT CONTENTS

Contact Beckman Coulter Customer Service to obtain the antibody concentration in the IOTest reagent.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any change in the physical appearance of the reagents may indicate deterioration and the reagent should not be used.

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address :

immuno-techsup@beckmancoulter.com

PRECAUTIONS

1. Do not use the reagent beyond the expiry date.
2. Do not freeze.
3. Let it come to room temperature (18 – 25°C) before use.
4. Minimize exposure to light.
5. Avoid microbial contamination of the reagents, or false results may occur.
6. Antibody solutions containing sodium azide (NaN₃) should be handled with care. Do not take internally and avoid all contact with the skin, mucosa and eyes. Moreover, in an acid medium, sodium azide can form the potentially dangerous hydrazoic acid. If it needs to be disposed of, it is recommended that the reagent be diluted in a large volume of water before pouring it into the drainage system so as to avoid the accumulation of sodium azide in metal pipes and to prevent the risk of explosion.
7. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (in particular: the wearing of protective gloves, gowns and goggles).
8. Never pipet by mouth and avoid all contact of the samples with the skin, mucosa and eyes.
9. Blood tubes and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.

SAMPLES

Venous blood must be taken using sterile tubes containing an EDTA salt as the anticoagulant. The samples should be kept at room temperature (18 – 25°C) and not shaken. The samples should be homogenized by gentle agitation prior to taking the test sample. The samples must be analyzed within 24 hours of venipuncture.

METHODOLOGY

NECESSARY MATERIAL NOT SUPPLIED

- Sampling tubes and material necessary for sampling.
- Automatic pipettes with disposable tips for 10, 100 and 500 µL.
- Plastic haemolysis tubes.
- Calibration beads: Flow-Set Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Red cell lysis reagent with washing stage after lysis. For example: VersaLyse (Ref. A09777).

- Leucocyte fixation reagent. For example : IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Mouse Isotypic control PC5: IOTest reagent (Ref. A09148).
- Buffer (PBS: 0.01 M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PROCEDURE

NOTE: The procedure below is valid for standard applications. Sample and/or VersaLyse volumes for certain Beckman Coulter applications may be different. If such is the case, follow the instructions on the application's technical leaflet. For each sample analyzed, in addition to the test tube, one control tube is required in which the cells are mixed in the presence of the isotypic control (Ref. A09148).

1. Add 10 µL of specific IOTest conjugated antibody to each test tube, and 10 µL of the isotypic control to each control tube.
2. Add 100 µL of the test sample to both tubes. Vortex the tubes gently.
3. Incubate for 15 to 20 minutes at room temperature (18 – 25°C), protected from light.
4. Then perform lysis of the red cells, if necessary, by following the recommendations of the lysis reagent used. For example, if you wish to use VersaLyse (Ref. A09777), refer to the leaflet and follow preferably the procedure called "with concomitant fixation", which consists in adding 1 mL of the "Fix-and-Lyse" mixture prepared extemporaneously. Vortex immediately for one second and incubate for 10 minutes at room temperature, protected from light. If the sample does not contain red cells, add 2 mL of PBS.
5. Centrifuge for 5 minutes at 150 x g at room temperature.
6. Remove the supernatant by aspiration.
7. Resuspend the cell pellet using 3 mL of PBS.
8. Repeat step 5.
9. Remove the supernatant by aspiration and resuspend the cell pellet using:
 - 0.5 mL or 1 mL of PBS plus 0.1% of formaldehyde if the preparations are to be kept for more than 2 hours and less than 24 hours. (A 0.1% formaldehyde PBS can be obtained by diluting 12.5 µL of the IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) at its 10X concentration in 1 mL of PBS).

- 0.5 mL or 1 mL of PBS without formaldehyde, if the preparations are to be analyzed within 2 hours.

NOTE: In all cases, keep the preparations between 2 and 8°C and protected from light.

PERFORMANCE

Performance data are obtained using the procedure described above on 24 hour-old blood samples previously collected on sterile tubes with EDTA salt as anticoagulant. Analysis is performed within 2 hours following immunostaining.

SPECIFICITY

The CD25 molecule, historically known by the name "Tac antigen", is the alpha chain of the Interleukine-2 receptor (IL-2Ralpha), a 55 kDa transmembranous glycoprotein (6).

The high affinity receptor for IL-2 is made up of three chains: alpha (IL-2R alpha, Tac, p55 or CD25), beta (IL-2Rbeta, p75 or CD122), and gamma (IL-2Rgamma, p64 or CD132).

The CD25 antigen is expressed on T CD4+ circulating lymphocytes and is not detected on CD8+ circulating lymphocytes (7). However, all the T lymphocytes express CD25 when activated. A sub-population of B lymphocytes (CD20+) expresses the CD25 antigen.

Circulating granulocytes, monocytes, NK cells, platelets and red-blood cells do not express the CD25 molecule (6).

The monoclonal antibody B1.49.9 was assigned to CD25 during the 2nd HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, held in Boston, USA, in 1984 (WS Code: T141, Section T) (8).

LINEARITY

To test the linearity of staining of this reagent, a positive cell line (FEV 20.3) and a negative cell line (DAUDI) were mixed in different proportions with a constant final number of cells, so that the positive line/negative cell line ratio of the mixture ranged from 0 to 100%.

Aliquots were stained using the procedure described above and linear regression between the expected values and the observed values was calculated.

Specificity	Linear regression	Linearity (R ²)
CD25	Y = 1.0141 X + 1.3093	0.9989

EXPECTED VALUES

Each laboratory must compile a list of reference values based upon a group of healthy donors from the local population. This must be done by taking age, sex and ethnic group into account, as well as any other potential regional differences.

In our laboratories, the whole blood samples of 50 healthy adults were treated using the reagent described above. The results obtained for the count of the positive events of interest with this reagent are given in the tables below :

Lymphocytes	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD25 +	50	10.88	5.12	47

INTRA-LABORATORY REPRODUCIBILITY

On the same day and using the same cytometer, 12 measurements of the percentage of staining of a positive target were carried out. The results obtained are summarized in the following table:

Positive Target	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
Lymphocytes CD25 +	12	21.18	1.69	7.96

LIMITATIONS OF THE TECHNIQUE

1. Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned perfectly, if fluorescence leaks have not been correctly compensated for and if the regions have not been carefully positioned.
2. It is preferable to use a RBC lysis technique with a washing step as this reagent has not been optimized for "no wash" lysis techniques.
3. Accurate and reproducible results will be obtained as long as the procedures used are in accordance with the technical insert leaflet and compatible with good laboratory practices.
4. The conjugated antibody of this reagent is calibrated so as to offer the best specific signal/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the reagent volume/sample volume ratio in every test.
5. In the case of a hyperleucocytosis, dilute the blood in PBS so as to obtain a value of approximately 5×10^9 leucocytes/L.

6. In certain disease states, such as severe renal failure or haemoglobinopathies, lysis of red cells may be slow, incomplete or even impossible. In this case, it is recommended to isolate mononucleated cells using a density gradient (Ficoll, for example) prior to staining.
7. CD45-negative or very weakly-positive acute lymphoblastic leukaemia have been described. For these, the lymphocytic origin of the blast cells should be confirmed using other markers.
8. Due to the tandem structure of the fluorochrome, PC5 also emits light at 575 nm. This secondary emission peak varies from lot-to-lot of PC5. Therefore, for multi-color analysis, the compensation matrix should be carefully checked when changing the lot of a PC5-conjugate.

MISCELLANEOUS

See the Appendix for examples and references.

TRADEMARKS

Beckman Coulter logo, COULTER, IOTest, are trademarks of Beckman Coulter; Beckman Coulter logo, IOTest and VersaLyse are registered in the USPTO and SIPO.

MANUFACTURED BY :

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Customer Services: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com

Printed in France.
Made in France.

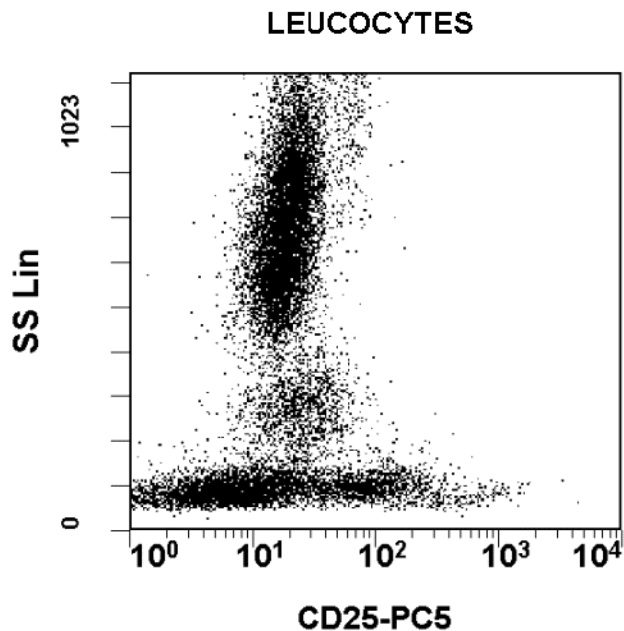
© 2012 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.



APPENDIX TO REF IM2646

EXAMPLES

The graph below is a biparametric representation (Side Scatter versus Fluorescence Intensity) of lysed normal whole blood sample. Staining is with IOTest CD25-PC5 Conjugated Antibody (Ref. IM2646). Acquisition is performed with a Beckman Coulter FC 500 flow cytometer equipped with the CXP analysis software



REFERENCES

1. Kottlán, B., Gyódi, E., Benczúr, K., Takács, T., Szabó, T., Troppmair, J., Onody, I., Petri, I., Kaiser, G., Kassai, M., Huber, C., Petrányi G.G., "The expression of activation markers and CD25 antigen on PBL in comparison with immune function after alloimmunization", 1987, in *Leukocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens*, McMichael, A.J., et al., Eds., Oxford Univ. Press, p. 534-536.
2. Borvak, J., Chou, C.S., Bell, K., Van Dyke, G., Zola, H., Ramilo, O., Vitetta, E.S., 1995, *J. of Immunol.*, "Expression of CD25 defines peripheral blood mononuclear cells with productive versus latent HIV infection", 155, 3196-3204.
3. Davis, B., H., Foucar, K., Szczarkowski, Ball, E., Witzig, T., Foon, K., A., Wells, D., Kotylo, P., Johnson, R., Hanson, C., and Bessman, D. "U.S. - Canada Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow Cytometry: Medical Indication", 1997, *Cytometry*, 30, 249-263.
4. Orfao, A., Ruiz-Arguelles, A., Lacombe, F., Ault, K., Basso, G., Danova, M. "Flow Cytometry: its application in hematology", 1995, *Haematologica*, 80, 69-81.
5. Braylan, R.C., Orfao, A., Borowitz, M.J., Davis, B.H., 2001, *Cytometry*, "Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: Results of an international consensus meeting". 46, 23-27.
6. Sasaki, Y., Sugamura, K., "CD25 Workshop panel report", 1997, *Leukocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens*. Kishimoto, T., et al, Eds., Garland Publishing, Inc., 802-804.
7. Kaplan, D., "Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines", 1996, *Immunol. Today*, 7, 17, 303-304.
8. Haynes, B.F., "Summary of T cell studies performed during the second International Workshop and Conference on Human Leukocytes Differentiation Antigens", 1986, *Leukocyte Typing II, Human T lymphocytes*, Reinherz, E.L., et al. Eds., Springer-Verlag, 3-30

IOTest
CD28-ECD

REF 6607111 - 100 tests

PN 4238108-CC



	CD28-ECD
Specificity	CD28
Clone	CD28.2
Hybridoma	Myeloma X63 Ag8.653 x BALB/c spleen cells
Immunogen	Transfected murine cell line
Ig Chain	IgG1
Species	Mouse
Source	Ascites fluid
Purification	Ion exchange or affinity chromatography
Fluorescence	Excites at 486-580 nm / Emits at 610-635 nm
Conjugation	ECD (Phycoerythrin-Texas Red-X)
Molar Ratio	ECD/Protein 0.5-1.5
Scatter Detection	Forward and/or side

For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.

SPECIFICITY

CD28 is a T-cell surface homodimeric molecule that belongs to the Ig superfamily.¹ It is composed of disulfide-linked chains with a molecular weight of 44 kD.²

CD28 is involved in cell adhesion T-B through the binding to its ligand B7/BB1 that is also the ligand for CTLA-4. CD28-B7 interaction is an important cosignal that allows T-cell proliferation and lymphokine production. CD28 is associated to a PI3 kinase activity.^{2,4}

The majority of CD4⁺ T-cells and 50% of CD8⁺ T-cells express CD28.³ The CD28.2 monoclonal antibody induces T-cell proliferation in costimulation with CD2 monoclonal antibodies.² It also inhibits the CD4⁺ proliferation in the allogeneic T-cell response.² This antibody has been studied at the 5th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens.²

REAGENT

See table above.

REAGENT CONTENTS

Contact Beckman Coulter Customer Service to obtain the antibody concentration in the IOTest reagent.

The nonantibody reagents are 2 mg/mL bovine serum albumin in phosphate-buffered saline containing 0.1% sodium azide.

STATEMENT OF WARNINGS

Iodoacetamide <0.1%
May produce an allergic reaction.
SDS Safety Data Sheet is available at techdocs.beckmancoulter.com .

1. This reagent contains 0.1% sodium azide. Sodium azide under acid conditions yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Azide compounds should be flushed with running water while being discarded. These precautions are recommended to avoid deposits in metal piping in which explosive conditions can develop. If skin or eye contact occurs, wash excessively with water.
2. Specimens, samples and all material coming in contact with them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.
3. Never pipet by mouth and avoid contact of samples with skin and mucous membranes.
4. Do not use antibody beyond the expiration date on the label.

5. Do not expose reagents to strong light during storage or incubation.
6. Use Good Laboratory Practices (GLP) when handling reagent.

STORAGE CONDITIONS AND STABILITY

This reagent is stable up to the expiration date when stored at 2-8°C. Do not freeze. Minimize exposure to light.

REAGENT PREPARATION

No reconstitution is necessary. This monoclonal antibody may be used directly from the vial. Bring reagent to 18-25°C prior to use.

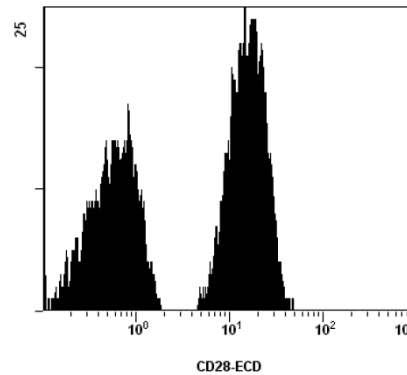
PROCEDURE

This reagent is designed for flow cytometry. Assay volume: 10 µL per 5 x 10⁵ cells in one test, or per 100 µL whole blood. A wash is required to yield optimal results.

EXAMPLE DATA

The histogram shown is a monoparametric representation (Count versus Fluorescence Intensity) of lysed normal whole blood sample stained with CD28-ECD monoclonal antibody (PN 6607111) and gated on lymphocytes.

Figure 1: Acquisition with a COULTER EPICS XL/XL-MCL flow cytometer.



SELECTED RESEARCH REFERENCES

1. McMichael, A.J. and Gotch, F.M., "T-cell antigens: new previously defined clusters", 1987, in Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens, A.J. McMichael et al., Eds., Oxford University Press, p. 30-62.
2. Olive D., Cerdan C., Costello R., Sielleur I., Ragueneau M., Pages F., Klasen S. Nunès J., Imbert J., "CD28 and CTLA-4 cluster report", 1995, in Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens, S. F. Schlossman et al., Eds., Oxford University Press, p. 360-370.
3. Tan, R., Teh, S.J., Ledbetter, J.A, Linsley, P., Teh, H.S. "B7 costimulates proliferation of CD4⁸ T

lymphocytes but is not required for the deletion of immature CD4⁸ Thymocytes", 1992, J. Immunol., 149, 3217-3224.

4. Nunès J., Klasen S., Ragueneau M., Pavon C., Couez D., Mawas C., Bagnasco M., Olive D., "CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events", 1993, International Immunology, 5, 3, 311-315.

PRODUCT AVAILABILITY


IOTest CD28-ECD Conjugated Antibodies
REF 6607111 - 100 tests (10 µL/test)

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

Texas Red-X is a trademark of Molecular Probes, Inc.

For additional information, or if damaged product is received, call Beckman Coulter Customer Service at 800-742-2345 (USA or Canada) or contact your local Beckman Coulter Representative.

 Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckmancoulter.com

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2015 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.



	Specificații
Specificitate	CD33
Clonă	D3HL60.251
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	HL60 human cell line
Imunoglobulină	IgG1 kappa
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)
Raport molar	PC5,5/Ig: 0,5-1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	692 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD33-PC5.5

REF B36289 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD33 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porțiilor (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Analiza antigenului CD33 ajută la caracterizarea celulelor blast de origine mieloidă (atât normale, cât și maligne) și este reprezentată eronat în subseturile de leucemie/limfom limfoblastic B și T (1, 2, 3).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: PC5,5reactiv IOTest (REF A62833)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalys

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A62833)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Antigenul CD33 este o glicoproteină transmembranară monomerică a cărei greutate moleculară este de 67 kDa. Această moleculă face parte din familia sialoadezinelor: proprietățile sale adezive depinde de prezența acidului sialic (4). Molecula CD33 este reprezentată în celulele progenitoare hematopoietice din liniile de celule mielomonocitare și eritroide, dar lipsește în celulele de origine limfoidă (5). Este puternic reprezentată în monocite și slab reprezentată în granulocitele în circulație. Anticorpul monoclonal D3HL60.251 a fost asociat cu CD33 în cursul celui de al 4-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor (4th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens), organizat la Viena, 1989 (cod WS: 504, secțiunea M) (4).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (6). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Monocite + CD33-PC5,5	3,0 Cells/ μ L
Granulocite + CD33-PC5,5	5,0 Cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Monocite + CD33-PC5,5	10	98,66	96,65	0,49	0,60	0,49	0,62
Granulocite + CD33-PC5,5	10	99,91	99,90	0,03	0,03	0,03	0,03

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (7).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (8).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și PC5,5 emite lumină la 575 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de PC5,5 la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -PC5,5.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD34
Clonă	581
Hibridom	NS0 x balb/c
Imunogen	Human CD34+ leukaemic cells
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)
Raport molar	ECD/Ig: 0,5-1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	613 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD34-ECD

REF B49202 100 de teste; 1 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD34 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD34 este o proteină transmembranară considerată un marcaj de celule progenitoare pentru o gamă largă de țesuturi/sisteme, inclusiv celule stem hematopoietice dezvoltate timpuriu, celule stroma mezenchimală multipotente (MSC), celule endoteliale din vasele mici (1, 2, 3). Proteina CD34 de la suprafața celulelor a fost folosită pe scară largă ca marcaj pentru a ajuta la identificarea și izolarea celulelor stem hematopoietice (HSCs) din măduva osoasă, sânge periferic mobilizat, sânge din cordonul ombilical și populația de celule după expansiune/crioprezervare ex vivo. (4). Pe lângă evaluarea potențialului multiplu al celulelor stem, CD34 se folosește în legătură cu alte marcaje (de exemplu, CD38, CD90) pentru a evalua progenitorii angajați funcțional și, mai recent, celule stem leucemice și din alte forme de cancer (5, 6, 7).

CD34 este în prezent considerat un marcaj pentru mai multe alte tipuri de celule nonhematopoietice, inclusiv progenitori endoteliali vasculari (8), celule stromale mezenchimală multipotente (MSC), celule dendritice interstițiale și progenitori epiteliali (1, 2, 3). Există numeroase exemple privind potențialul de diferențiere al CD34 ca marcaj în diferite țesuturi nonhematopoietice, de obicei în asociere cu alte marcaje. Cu toate acestea, în ciuda utilității sale ca marcaj pentru celulele stem, funcția CD34 în aceste sisteme rămâne una vagă. CD34 este considerat în general ca un marcaj pentru celulele vasculare precursore endoteliale (9, 10, 11). Aceste celule derivate BM se găsesc în circulație în sângele periferic și utilitatea lor în terapiile proangiogenice a fost cercetată pe scară extinsă (11, 12).

Pe scurt, CD34 este considerat un antigen de suprafață adecvat pentru selectarea subpopulațiilor de celule progenitoare din populații mai mari de celule, inclusiv celule mezenchimală, și nu este asociat numai cu celulele hematopoietice și endoteliale (13). Celulele CD34+ din multe tipuri de țesuturi reprezintă o sursă de celule progenitoare care pot fi exploatate clinic în strategii de medicină regenerativă (14, 15).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS

Fișa tehnică de securitate este disponibilă la
beckman.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 µl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotopic: ECDreactiv IOTest (REF A07797)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalysse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotopic (REF A07797)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 µl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 µl de ser de control izotopic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 µl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 µl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

Datele privind performanța au fost obținute pe o linie de celule pozitive KG1a. Analiza a fost efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

CD34 este o proteină transmembranară monomerică puternic glicozilată de tip I, cu greutatea moleculară de 116 kDa (2). Există două forme moleculare de CD34; forma completă cu 385 de secvențe amino are un domeniu intracelular care conține consensusul de proteină kinază C, serină și fosforilare treonină. Formei trunchiate îi lipsește cea mai mare parte din domeniul intracelular. Forma extracelulară este prezentă în ambele forme de CD34. Pentru CD34 au fost descoperiți trei tipuri de epitopi pe baza unei sensibilități diferite la epitopii de neuramidază și glicoprotează Clasa I (BEC Immu133. My10, BI-3C5, 12.8, ICH3) sunt sensibili la toate enzimele proteolitice. Epitopii Clasa II (QBEnd10) sunt rezistenți la neuraminidază, dar sunt sensibili la glicoprotează. Clona 581 recunoaște un epitop de clasă tip III și este insensibilă la toate enzimele proteolitice și se combină avid cu toate glicoforme de CD34 (16).

Al 5th HLDA workshop (5-lea congres HLDA) (Boston 1993) a aprobat cele trei tipuri de epitopi ai CD34 pe baza diferențelor în sensibilitate.

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (17). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Tinta pozitivă	Limita de detecție
KG1a+ CD34-ECD	2,0 cells/μl

PRECIZIE

PRECIZIE

Procentajul de evenimente pozitive a fost determinat cu ajutorul a zece replici utilizând o linie de celule pozitive KG1a, în aceeași zi și pe același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Tinta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2
KG1a+ CD34-ECD	10	100,00	99,99	0,00	0,01	0,00	0,01

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (18).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (19).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și ECD emite lumină la 575 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de ECD la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -ECD.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Texas Red-X este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD38
Clonă	LS198-4-3
Hibridom	SP2/0 x balb/c
Imunogen	Human T cell line HUT 78
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750
Raport molar	APC-AlexaFluor750/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	633/638 nm
Vârful de emisie	775 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD38-APC-Alexa Fluor 750

REF B49200 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD38 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porțiilor (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Caracterizarea și enumerarea populațiilor de leucocite care prezintă molecula CD38 în boli ale sistemului imunitar au rezultat în principal în supra-reprezentarea moleculei CD38 legate de activarea celulară cu deficite imune, infecții virale și boli maligne ale celulelor B (B-CLL și discrazii ale celulelor plasmatiche) (1,2,3,4). În cazul HIV/SIDA, reprezentarea CD38 în celulele T a fost legată de activarea celulară și este potențial utilă pentru evaluarea sistemului imunitar (5,6). Rutina clinică confirmă faptul că celulele din clona de mielomă prezintă CD38 în marea majoritate a pacienților, dar la densități diferite la suprafață (7). Există o asociere între reprezentarea CD38 în celulele CLL și un comportament clinic mai agresiv (8,9,10). CD38 este prezent în majoritatea clonelor leucemice mai agresive clinic care necesită tratament (9,10). Recent, CD38 a fost selectat ca țintă principală pentru terapia mediată prin mAb (11).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: APC-AlexaFluor750reactiv IOTest (REF A79393)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURA CU REACTIVUL VERSALYSE

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A79393)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Antigenul CD38, care mai este denumit și antigen T10, este o glicoproteină transmembranară de tip II cu lanț unic, a cărei secțiune N terminală este citoplasmică (1,12). Această glicoproteină cu o masă moleculară apropiată de 45 kDa este reprezentată într-un număr mare de celule hematopoietice: distribuția sa depinde de etapa de diferențiere și de gradul de activare celulară. Molecula funcțională apare ca un dimer sau ca un multimer (13,14,15). O funcție atribuită inițial CD38 este regularea activării și proliferarea limfocitelor T umane (5,6 și 16).

Ligatura CD38 de anticorpi mAb agonistici induce fluxuri rapide de Ca²⁺ și declanșează fosforilarea unei cascade de substraturi intracelulare, conducând la activarea complexului NF-κB (17,18). În compartimentul de celule B, CD38 este reprezentat la niveluri ridicate numai în măduva progenitoare comisă (celulele BM timpurii sunt CD38–) și în limfocitele B din centrele germinale, în celule de plasmă diferențiate terminal și în tonsile activate (8,9,10). În schimb, limfocitele B mature virgine și limfocitele B de memorie prezintă niveluri reduce ale moleculei. Mai precis, la nivelul diferențierii limfocitice a celulelor B, reprezentarea moleculei CD38 apare în etapele timpurii și dispare la maturarea celulelor B și reapare în etapa finală a diferențierii (etapa plasmocitică).

Molecula CD38 este reprezentată în limfocitele din celulele T și B activate (19,20), monocite și majoritatea celulelor NK, timocite medulare (21,22) și în plachetele (23) și celule roșii (24). Reprezentarea CD38 în celulele T din limfocitele în circulație este slabă. Anticorpul monoclonal LS198 a fost asociat cu CD38 în cursul celui de al 5-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor (5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens), organizat la Boston, Statele Unite, în 1993 (cod WS: T-CD38.06, secțiunea T) (24).

LIMITA DE DETECȚIE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (25). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Limfocite + CD38-APCA750	2,0 cells/ μ L
Monocite + CD38-APCA750	1,0 cells/ μ L
Granulocite + CD38-APCA750	1,0 cells/ μ L

PRECIZIE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Limfocite + CD38-APCA750	10	63,11	41,24	0,65	0,69	1,04	1,68
Monocite + CD38-APCA750	10	99,85	99,49	0,14	0,34	0,14	0,35
Granulocite + CD38-APCA750	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (26).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (27).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și APC-AlexaFluor750 emite lumină la 660 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de APC-AlexaFluor750 la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -APC-AlexaFluor750.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Alexa Fluor este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD55
Clonă	JS11KSC2.3
Hibridom	X63 x balb/c
Imunogen	NA
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	R Phycoerythrin (PE)
Raport molar	PE/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	575 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest CD55-PE

REF B49190 100 de teste; 2 ml, 20 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea și enumerarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD55 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOTest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD55, denumit și factor de accelerare a degradării celulelor complementare (DAF), leagă C3bBb (convertaza de cale alternativă) și C4b2a (convertaza de cale clasică) pentru a accelera degradarea convertazelor C3, protejând astfel împotriva activării inadecvate a celulelor complementare (1). Hemoglobinuria nocturnă paroxistică (PNH) este o boală rară hematopoietică a celulelor stem caracterizată printr-o mutație somatică în gena PIGA, care conduce la reducerea sau pierderea ancorelor de glicofosftidilinositol (GPI) din membrana celulei, inclusiv CD55 și CD59 la eritrocite. Nivelul de deficiență de GPI este folosit pentru a diferenția boala PNH astfel: tip I (deficiență completă), tip 2 (deficiență parțială) și tip III (deficiență normală). Citometria de flux este metoda preferată pentru diagnosticarea în laborator a bolii PNH. Au fost publicate o serie de recomandări care oferă instrucțiuni despre panouri și strategia de gating pentru populația de celule (2,3,4).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckmancoulter.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Probele trebuie păstrate la temperatura camerei (18–25°C) și nu trebuie agitate. Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 20, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: PEreactiv IOTest (REF A07796)
- Anticorpi conjugați specifici -PE din gama IOTest.
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalyse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A07796)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 20 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 20 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

CD55/DAF este un membru al familiei de proteine de control complementare, care mai sunt denumite regulatori pentru activarea complementării (5). DAF este o proteină ancorată în glicosilfosfatidilinositol, care se găsește la suprafața celor mai multe celule. Ea disociază convertazele C3 legate la celulele corpului, C4b2a și C3bBb, într-o etapă timpurie a cascadei de amplificare complementară, protejând prin urmare celulele corpului de atacul celulelor complementare. Regiunea sa extracelulară conține patru repetări de consens scurt 60-aa (SCR), urmate de o regiune bogată în O-glicozilare 97-aa). Au fost identificate două variante sau izoforme de CD55: CD55 (wt) se întâlnește mult mai des (de aproximativ 48 de ori mai des) decât CD55(int7+), care conține o parte din intron 7 sau acest compus în integralitatea sa. JS11KSC2.3 a fost asociat cu clusterul CD55 de diferențiere la Vllth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens s (Al 6-lea simpozion internațional pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor), organizat la Kobe (1996), sub numele JS 11 (6).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (7). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Limfocite + CD55-PE	7,0 cells/ μ L
Monocite + CD55-PE	1,0 cells/ μ L
Granulocite + CD55-PE	2,0 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2
Limfocite + CD55-PE	10	99,86	99,79	0,08	0,04	0,08	0,04
Monocite + CD55-PE	10	99,92	99,97	0,12	0,05	0,12	0,05
Granulocite + CD55-PE	10	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (8).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (9).

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD56
Clonă	N901
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Human chronic myeloid leukemia (hCML) cells
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Allophycocyanin-Alexa Fluor 700
Raport molar	APC-AlexaFluor700/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	633/638 nm
Vârful de emisie	720 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD56-APC

-Alexa Fluor 700

REF B92446 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD56 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Anticorpul monoclonal (mAb) N901 (sau NKH-1) recunoaște antigenul CD56, care este prezent în majoritatea celulelor NK (Natural Killer) din sângele periferic (1,2) și într-o subpopulație de limfocite ale celulelor T circulante (CD3+) (3). Celulele NK sunt caracterizate prin activitate citotoxică congenitală și specifică; aceasta are loc atunci când este spart echilibrul dintre semnalele inhibitoare primite la nivelul receptorilor lor denumiți KIR (receptori celule Killer de tip imunoglobulină) și semnalele de activare primite la nivelul receptorilor lor NCR (citotoxicitate naturală). Astfel, receptorii KIR ai celulelor NK, recunoscând un număr suficient de molecule HLA clasa I la suprafața celulei țintă, furnizează un semnal capabil să inhibe liza. Invers, dacă aceste molecule HLA sunt în număr insuficient (cazul celulelor tumorilor sau al celulelor infectate de un virus), atunci semnalul de liză transportat de receptorii NCR nu este inhibat, conducând la lizarea celulei țintă (4).

La indivizii sănătoși, peste 95 % din celulele capabile să inducă această activitate citotoxică congenitală și specifică se găsesc în aproximativ 15 % din limfocitele din sângele periferic care prezintă antigenul NKH-1. Acest reactiv permite caracterizarea populațiilor celulare sau a subpopulațiilor cu activitate NK și/sau citotoxică asociată cu fenotipul CD56+. De asemenea, el permite studiarea acestor populații în boli ale sistemului imunitar: SIDA și ale deficienței imunitare (2), boli autoimune, hipersensibilitate, infecții virale și restaurarea unui răspuns imunitar după un transplant de măduvă osoasă și/sau de alt organ (5). În fine, mai poate fi folosit pentru fenotiparea discraziilor maligne ale sângelui, cum ar fi leucemii și limfoame (6, 7, 8, 9).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârful de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: APC-AlexaFluor700reactiv IOTest (REF A79391)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv VersaLyse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A79391)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 10 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Greutatea moleculară proteinei CD56 puternic glicozilate (molecula NKH1) este de 200–220 kDa (1,3). Ea este prezentă într-o subpopulație de limfocite din sângele periferic care prezintă citotoxicitate restrânsă la complexul de histocompatibilitate non-major (1,2). Anticorpul monoclonal N901 (NKH-1) reacționează cu majoritatea celulelor NK (1,3). El mai reacționează și cu o subpopulație minoră de celule T pozitive CD3 care mediază o activitate citotoxică redusă (2). Acest anticorp nu reacționează cu monocitele, granulocitele, eritrocitele și limfocitele B. Anticorpul N901 (NKH-1) a fost atribuit clusterului CD56 de diferențiere cu ocazia 4th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al patrulea congres internațional consacrat antigenilor de diferențiere din leucocitele umane), organizat la Viena, Austria, în 1989 (10).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (11). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Lymphocytes CD56-APC-A700+	3,0 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Lymphocytes CD56-APC-A700+	10	20,55	21,85	0,36	1,38	1,73	6,34

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (12).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (13).
7. Din cauza structurii în tandem a fluorocromului, și APC-AlexaFluor700 emite lumină la 660 nm. Acest al doilea vârf de emisie diferă de la un lot de APC-AlexaFluor700 la altul. Prin urmare, pentru analiza multicolorimetrică, matricea de compensare trebuie verificată atent la schimbarea lotului de conjugat -APC-AlexaFluor700.

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Alexa Fluor este o marcă comercială a Molecular Probes, Inc.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD59
Clonă	P282E
Hibridom	NS1 x balb/c
Imunogen	Human red cells
Imunoglobulină	IgG2a
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Raport molar	FITC/Ig: 4 - 7
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	525 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest CD59-FITC

REF B49187 100 de teste; 2 ml, 20 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea și enumerarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD59 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOTest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD59 este în celulele umane un inhibitor de suprafață a celulei pentru complexul de atac al membranei (MAC). El este distribuit pe scară largă în majoritatea țesuturilor și în toate celulele în circulație. CD59 regulează liza celulelor mediată prin complemente și este implicat în transducerea semnalului limfocitelor. Citometria de flux este cea mai sensibilă metodă de determinare cantitativă pentru stabilirea prezenței CD59 la suprafața celulelor normale sau maligne (1,2).

Mutațiile în CD59 cauzează deficiență CD59, o boală care determină anemia hemolitică și tromboza. Mutațiile care afectează ancorele de glicofosfolipid (GPI), cum este și CD59, cauzează hemoglobinuria nocturnă paroxistică (PNH) (3,4). Incidența defectului de tip PNH a mai fost demonstrată în multe boli hematologice și în celulele de sânge periferic (PBC) de la indivizi normali (5,6,7,8,9,10,11).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos



Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckmancoulter.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Probele trebuie păstrate la temperatura camerei (18–25°C) și nu trebuie agitate. Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 20, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: FITCreactiv IOTest (REF 6603855)
- Anticorpi conjugați specifici -FITC din gama IOTest.
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv Versalyse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF 6603855)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 20 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 20 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Glicoproteina CD59 umană este o proteină membranară mică (~19 kDa), puternic glicozilată, ancorată în GPI globular (12). Glicoproteina CD59 care mai este cunoscută ca proteină inhibitoare de MAC (MAC-IP), inhibitor membranar pentru liza reactivă (MIRL), este o proteină care este codată la oameni de gena CD59. CD59 este definit ca un regulator C asociat membranei și face parte dintr-o baterie de proteine inhibitoare care include moleculele ancorate în GPI CD55 și CD46. Aceste proteine protejează celulele de atacul celulelor complementare și a posibila liză reactivă (1). CD59 inhibă practic încorporare de copii multiple de C9 în complexul C5b678 în cursul atacului membranei complementare asupra celulelor gazdă. P282E a fost asociat clusterului CD59 de diferențiere la 5th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al 5-lea simpozion HLDA pentru antigenii umani de diferențiere a leucocitelor), organizat la Boston, SUA, în 1993 (13).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (14). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analiz care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Tinta pozitivă	Limita de detecție
Limfocite + CD59-FITC	6,0 cells/ μ L
Monocite + CD59-FITC	3,0 cells/ μ L
Granulocite + CD59-FITC	1,0 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Tinta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2	Proba 1	Proba 2
Limfocite + CD59-FITC	10	99,98	99,99	0,05	0,02	0,05	0,02
Monocite + CD59-FITC	10	99,88	100,00	0,37	0,00	0,37	0,00
Granulocite + CD59-FITC	10	99,98	100,00	0,05	0,00	0,05	0,00

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (15).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (16).

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
Specificitate	CD138
Clonă	B-A38
Hibridom	X63 x balb/c
Imunogen	U266 cell line
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Allophycocyanin (APC)
Raport molar	APC/Ig: 0,5 - 1,5
Excitare λ	633/638 nm
Vârful de emisie	660 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

CD138-APC

REF B49219 50 de teste; 0,5 ml, 10 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul CD138 prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

CD138 este asociat cu etapa târzie a diferențierii celulelor B (celule de plasmă). CD138 nu este prezent în celule B în curs de maturare/mature. CD138 este considerat un marker esențial pentru detecția celulelor de plasmă prin citometrie de flux (1,2). În combinație cu alți markeri precum CD38, CD45, CD19, CD56, CD20, CD28 și CD117, CD138 este folosit pe scară largă pentru identificarea bolilor legate de celule de plasmă, inclusiv mielomă multiplă, gamopatia monoclonală de origine necunoscută (GMON) și mai rar pentru leucemii de celule de plasmă (3,4,5,6).

CD138 a fost descris ca fiind prezent în anumite limfoame umane non-Hodgkin și keratoacantoame, prezența sa fiind invers proporțională cu agresivitatea și invazibilitatea tumorii (7,8). Mai recent, a fost descrisă o terapie țintită prin producerea unei proteine de fuziune care conține IFNα2 cu scopul țintirii celulelor care prezintă CD138, în speranța ca IFN să inhibe proliferarea și să inducă apoptoza celulei primare la pacienții cu MM (9).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.

În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.

7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

1. În fiecare eprubetă, adăugați volumul adecvat 10 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la punctia venoasă pe probe recoltate anterior conform procedurii descrise în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

CD138 este un proteoglican sulfat de heparină sindecan-1 cu domeniu transmembrantar și citoplasmic de tip I foarte bine conservat și un domeniu extracelular de dimensiune variabilă, care conține lanțuri legate covalent de sulfat de heparină. Sindecanul joacă un rol în controlul creșterii, răspândirea celulelor, recunoașterea celulară, aderența și semnalarea celulară, posibil drept co-receptor cu integrine și molecule de aderență celulă-celulă, colaborând cu alți receptori pentru a regula semnalarea celulelor și organizarea citoscheletală (10,11).

Anticorpul monoclonal B-A38 a fost studiat la 8th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Al 8-lea simpozion HLDA pentru antigenii de diferențiere a leucocitelor umane), organizat la Adelaide, Australia, în 2004 (12).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (13). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Tinta pozitivă	Limita de detecție
U266B1+ CD138-APC+	1,0 cell/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
U266B1+ CD138-APC+	10	99,14	99,10	0,08	0,11	0,08	0,11

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (14).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (15).

MĂRCI COMERCIALE





Beckman Coulter și logoul Beckman Coulter stilizat, Flow-Check, IOTest, VersaLyse, Navios și Flow-Set sunt mărci comerciale deținute de Beckman Coulter, Inc. și sunt înregistrate la Oficiul de Mărci și Brevete al S.U.A. (USPTO).

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

ClearLab 10C Panels

ClearLab 10C	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-A750	Pacific Blue	Krome Orange
B Cell Tube	Kappa	Lambda	CD10	CD5	CD200	CD34	CD38	CD20	CD19	CD45
T Cell Tube	TCR $\gamma\delta$	CD4	CD2	CD56	CD5	CD34	CD7	CD8	CD3	CD45
M1 Cell Tube	CD16	CD7	CD10	CD13	CD64	CD34	CD14	HLA-DR	CD11b	CD45
M2 Cell Tube	CD15	CD123	CD117	CD13	CD33	CD34	CD38	HLA-DR	CD19	CD45

-  B96805 – 25 tests
-  B96806 – 25 tests
-  B96807 – 25 tests
-  B96808 – 25 tests

PN C00197-AE



For In Vitro Diagnostics Use

Rx Only in the U.S.A.

INTENDED USE

The ClearLab 10C Panels are intended for in vitro diagnostic use for qualitative identification of cell populations by multiparameter immunophenotyping on the Navios and Navios EX flow cytometers. These reagents are used as an aid in the differential diagnosis of hematologically abnormal patients having, or suspected of having, the following hematopoietic neoplasms: chronic leukemia, acute leukemia, non-Hodgkin lymphoma, myeloma, myelodysplastic syndrome (MDS), and/or myeloproliferative neoplasms (MPN). The reagents can be used with peripheral whole blood (collected in K₂EDTA, Acid Citrate Dextrose (ACD) or Heparin), bone marrow (collected in K₂EDTA, ACD or Heparin) and lymph node specimens. Interpretation of the results should be confirmed by a pathologist or equivalent professional in conjunction with other clinical and laboratory findings.

These reagents provide multiparameter, qualitative results for the surface antigens listed below:

- ClearLab 10C B Cell Tube: Kappa, Lambda, CD10, CD5, CD200, CD34, CD38, CD20, CD19, CD45
- ClearLab 10C T Cell Tube: TCR $\gamma\delta$, CD4, CD2, CD56, CD5, CD34, CD7, CD8, CD3, CD45
- ClearLab 10C M1 Cell Tube: CD16, CD7, CD10, CD13, CD64, CD34, CD14, HLA-DR, CD11b, CD45
- ClearLab 10C M2 Cell Tube: CD15, CD123, CD117, CD13, CD33, CD34, CD38, HLA-DR, CD19, CD45

INTENDED USER

This product is intended for laboratory professional use.

SUMMARY OF EXPLANATION

The specific choices and combinations in the ClearLab 10C Panels are based on the guiding principles of (1) addressing the clinical indications, (2) accounting for all major cell populations present in the specimen, and (3) providing sufficiently comprehensive identification of all major categories of hematopoietic cell populations in both normal and neoplastic states.¹⁻⁷

CD45 is a pan-leukocyte antigen that is differentially expressed on different leukocyte populations. In combination with Side scatter, CD45 can be used to define discrete population gates for identification of the lineage specific antigens. CD45 is used as a common gating reagent in all ClearLab 10C Panels so that analyses from each tube can be correlated.¹

The CD45 antigen is expressed on every type of hematopoietic cell except mature erythrocytes and their immediate progenitors. It has not been detected in differentiated nonhematopoietic tissue.

T and NK Cell Characterization

Cell surface antigens appear to be acquired and lost by T lymphocytes in a manner reflecting the maturational (differentiation) and/or functional state of the cell. Once acquired, the same cell may co-express some or all of these antigens for varying periods of time.

The TCR $\gamma\delta$ antigen is expressed on a set of specialized T cells in the immune system. TCR $\gamma\delta$ cells play an important role in pathogenic diseases as an early defense mechanism that promotes TCR $\gamma\delta$ cell differentiation and recruitment to sites of infection. TCR $\gamma\delta$ cells predominate in the epithelial lining of the intestine, lung, skin, and reproductive tract, often the front line of host defense.³⁷

The CD4 antigen is present on thymocytes and the inducer T lymphocyte population in peripheral blood. It is also expressed at low density on monocytes.

The CD2 antigen is an early, lineage-specific pan T cell surface antigen and normally is present on some bone marrow prothymocytes, on over 95% of thymocytes, on all peripheral T lymphocytes and on a subpopulation of natural killer cells. Once present, the CD2 antigen is expressed continuously throughout T lymphocytes differentiation. The CD2 antigen is not detected on peripheral blood B lymphocytes, monocytes, granulocytes or platelets.

The CD56 antigen is expressed on a subpopulation of lymphocytes that demonstrate natural killer (NK) activity. Virtually all of these cells capable of mediating non-TCR mediated cytotoxicity in peripheral blood express CD56. This subpopulation consists of both natural killer cells (CD3-/CD56+) and a small subset of T cells (CD3+/CD56+). CD56 is not expressed on other T or B lymphocyte, monocyte, granulocyte or erythrocyte populations.

The CD5 antigen is present on all mature T lymphocytes and on most thymocytes. CD5 is also present on a B lymphocyte subset but is not found on granulocytes or monocytes.

The CD34 antigen is expressed on hematopoietic progenitor cells of all lineages as well as the pluripotent stem cells. CD34 antigen expression is highest on the most primitive stem cells and is gradually lost as lineage committed progenitors differentiate. The CD34 antigen is also present on capillary endothelial cells and on bone marrow stromal cells.

The CD7 antigen is found on thymocytes and on the majority of peripheral blood T lymphocytes. It is also expressed on most NK cells, a subpopulation of pre-B lymphocytes, on B-lymphocytes originating from fetal bone marrow, and on pluripotent hematopoietic stem cells. Mature B lymphocytes, cells of erythrocytic, myeloid, and megakaryocytic lineage do not normally express CD7. CD7 may also be expressed in an aberrant manner in many cases of immature acute myeloid leukemia.

The CD8 antigen is normally present on approximately 80% of thymocytes and approximately 30-35% of peripheral blood T lymphocytes and some natural killer cells.



The CD3 antigen is normally present on the cell surface of mature thymocytes and resting and activated peripheral blood mature T lymphocytes (both inducer and suppressor/cytotoxic populations).

B Cell and Kappa and Lambda Characterization

Cell surface antigens appear to be acquired and lost by B lymphocytes in a manner reflecting the maturational (differentiation) and/or functional state of the cell. Once acquired, the same cell may coexpress some or all of these antigens for varying periods of time.

Expression of pan B cell surface antigens by B lymphocytes occurs in the following sequence: CD19 (committed B cell progenitor/pre-pre-B cell); CD20 (early pre-B cell). Once expressed, the CD19 and CD20 antigens are coexpressed continuously throughout the remainder of B lymphocyte differentiation including the resting and the activated mature peripheral blood or lymphoid tissue B lymphocyte. Both antigens are lost at the last stage of B lymphocyte differentiation, the plasma cell.

The Kappa antigen is expressed on the surface of a subpopulation of approximately one half to two-thirds of mature B cells in peripheral blood. This light chain is also found on the surface of a subpopulation of immature bone marrow B lymphocytes.

The Lambda antigen is expressed on the surface of a subpopulation of approximately one-third to one half of mature B cells in peripheral blood. This light chain is also found on the surface of a subpopulation of immature bone marrow B lymphocytes.

The CD10 antigen is expressed on uncommitted lymphoid precursors. CD10 expression is lost as cells enter the T lineage. In the B lineage, CD10 expression is lost later in ontogeny, as cells acquire surface immunoglobulin expression. It is also expressed on activated and proliferating B cells in the germinal center, and on neutrophils as well as bone marrow stromal cells. Additionally, it is expressed on a number of other cells of epithelial origin.

The CD5 antigen is present on all mature T lymphocytes and on most thymocytes. CD5 is also present on a B lymphocyte subset but is not found on granulocytes or monocytes.

CD200 is a transmembrane protein broadly expressed on a variety of cell types, which delivers immunoregulatory signals through binding to receptors (CD200Rs) expressed on monocytes/myeloid cells and T lymphocytes. Signals delivered through the CD200:CD200R axis have been shown to play an important role in the regulation of anti-tumor immunity, and overexpression of CD200 has been reported in a number of malignancies, including CLL, as well as on cancer stem cells.³⁴

The CD34 antigen is expressed on hematopoietic progenitor cells of all lineages as well as the pluripotent stem cells. CD34 antigen expression is highest on the most primitive stem cells and is gradually lost as lineage committed progenitors differentiate. The CD34 antigen is also present on capillary endothelial cells and on bone marrow stromal cells.

The CD38 antigen is expressed differentially on B lymphocytes during maturation. The expression of the CD38 antigen appears during the early stages, disappears during B cell maturation, and re-appears during the final stage of differentiation (plasma cell stage). The CD38 molecule is also expressed by activated T and B cell lymphocytes, monocytes, most NK cells, medullary thymocytes⁹ platelets and red blood cells.

The CD20 antigen is present on all normal B lymphocytes from peripheral blood, lymph node, spleen, tonsil and bone marrow but is absent from plasma cells. It is expressed naturally but at low density on a subset of peripheral blood T lymphocytes.

The CD19 antigen is expressed on all B cells, including early progenitor B cells. It can also be found on follicular dendritic cells and myelomonocytic lineage progenitor cells, but is not expressed on T cells, monocytes or granulocytes.

Myeloid Cell Characterization

Cell surface antigens appear to be acquired and lost by myeloid lineage cells in a manner reflecting the maturational (differentiation) and/or functional state of the cell. Once acquired, the same cell may co-express some or all of these antigens for varying periods of time.

The CD16 antigen is the low affinity receptor of the G class immunoglobulins (IgG) (FcγRIII) expressed on NK cells, monocytes, macrophages and neutrophils.^{22,23,40} The genetic heterogeneity of CD16 generates alternative membrane-anchored molecules. One is a transmembrane form (FcγRIIIA, 50-65 kD) expressed on NK cells, monocytes and macrophages.⁴⁰ The other is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored form (FcγRIIIB, 48 kD) only expressed on neutrophils.^{22,23}

The CD7 antigen is found on thymocytes and on the majority of peripheral blood T lymphocytes. It is also expressed on most NK cells, a subpopulation of pre-B lymphocytes, on B-lymphocytes originating from fetal bone marrow, and on pluripotent hematopoietic stem cells. Mature B lymphocytes, cells of erythrocytic, myeloid, and megakaryocytic lineage do not normally express CD7. CD7 may also be expressed in an aberrant manner in many cases of immature acute myeloid leukemia.

The CD10 antigen is expressed on uncommitted lymphoid precursors. CD10 expression is lost as cells enter the T lineage. In the B lineage, CD10 expression is lost later in ontogeny, as cells acquire surface immunoglobulin expression. It is also expressed on activated and proliferating B cells in the germinal center, and on neutrophils as well as bone marrow stromal cells. Additionally, it is expressed on a number of other cells of epithelial origin.

The CD13 antigen is found on most cells of myeloid origin including neutrophils, eosinophils, basophils and monocytes from normal peripheral blood. It is absent from lymphocytes as well as from red blood cells and platelets. This molecule is found on the surface of committed progenitor cells defined as Granulocyte-Monocyte Colony Forming Units (GM-CFU) in normal bone marrow.

The CD64 is a high-affinity and restricted isotype-specificity FcγRI receptor expressed on macrophages, monocytes, neutrophils, and eosinophils.^{38, 39}

The CD34 antigen is expressed on hematopoietic progenitor cells of all lineages as well as the pluripotent stem cells. CD34 antigen expression is highest on the most primitive stem cells and is gradually lost as lineage committed progenitors differentiate. The CD34 antigen is also present on capillary endothelial cells and on bone marrow stromal cells.

The CD14 antigen is found on cells of the myelomonocytic lineage; strongly expressed on monocytes and macrophages and moderate to dim expression on peripheral blood neutrophils, and is present on pleural phagocytes and dendritic reticular cells. It is also weakly expressed by B lymphocytes, but is absent from T lymphocytes as well as from NK cells, erythrocytes and platelets.^{27, 28}

The HLA-DR antigen is found on antigen-presenting cells (APC), such as dendritic cells, B lymphocytes, monocytes, macrophages and thymic epithelial cells, but not on granulocytes, platelets, or red blood cells.^{29,30} Stem Cells and hematopoietic progenitors express HLA-DR in the early stages of differentiation.^{29,31} On T lymphocytes, the HLA-DR antigen is only expressed after activation.³²

Expression of the CD11b chain on the cell surface requires the presence of the CD18 antigen (also known as β2 integrin chain). Together, these two subunits create the CD11b/CD18 integrin, one of the 4 integrin heterodimers that can be built by the association of CD18β chain with 4 distinctive CD11α chains. CD11b/CD18 is highly expressed on natural killer (NK) cells, neutrophils, monocytes and macrophages.



CD15 antigen is expressed during hematopoiesis on myeloid progenitor cells. It is strongly expressed by mature cells of myelomonocytic lineage (neutrophils, eosinophils, monocytes, macrophages, mast cells). CD15 is not expressed on normal erythrocytes, platelets or lymphocytes.²⁰⁻²¹

The CD123 is more restricted to IL-3-responsive cells, including hematopoietic stem/progenitor cells (HS/PCs), monocytes, megakaryocytes, B-lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells (pDCs). The expression of CD123 is low or negative in primitive hematopoietic cells and erythroid progenitor cells; while relatively high in myeloid and B-lymphoid progenitor cells.³⁵ CD123 is highly expressed on the surface of various cells (e.g., leukemia stem cells, LSCs), and it is associated with the initiation and development of many diseases, such as acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL).³⁶

CD117 antigen is the 145 kD proto-oncogene c-kit.²⁴ Within the hematopoietic compartment, the CD117 molecule is expressed on approximately 50 % of CD34+ progenitors engaged in erythrocytic,²⁵ myelomonocytic and megakaryocytic differentiation.²⁶ CD117 is also expressed on mast cells, but it is not found on any other mature hematopoietic cells.

The CD33 antigen is strongly expressed on monocytes in peripheral blood, and weakly on circulating granulocytes. In the bone marrow it is found on hematopoietic progenitor cells of the myelomonocytic and erythroid lineage, but absent from cells of lymphoid origin.³³

The CD38 antigen is expressed differentially on B lymphocytes during maturation. The expression of the CD38 antigen appears during the early stages, disappears during B cell maturation, and re-appears during the final stage of differentiation (plasma cell stage). The CD38 molecule is also expressed by activated T and B cell lymphocytes, monocytes, most NK cells, medullary thymocytes,⁹ platelets and red blood cells.

The CD19 antigen is expressed on all B cells, including early progenitor B cells. It can also be found on follicular dendritic cells and myelomonocytic lineage progenitor cells, but is not expressed on T cells, monocytes or granulocytes.

PRINCIPLES OF TEST

The tests depend on the ability of monoclonal or polyclonal antibodies binding to the surface of cells expressing discrete antigenic determinants. Specimens are washed to remove endogenous plasma proteins that may interfere with the binding specificity of antibodies. Specific cell staining is accomplished by incubating washed specimen cells with the appropriate antibody reagent. The ClearLLab 10C Panels are composed of 4 multicolor tubes directed against lymphoid and myeloid lineage antigens. Each tube is composed of ten monoclonal or polyclonal antibody reagents each conjugated to a distinct fluorochrome and specific for different cell surface antigens. Red blood cells are lysed with the IOTest 3 Lysing Solution. After sample preparation, the samples are analyzed on Navios and/or Navios EX flow cytometer instruments. The List Mode Data files are analyzed offline using Kaluza C Software with an appropriate combination of subpopulation gates.

Dot plots gated on all "Ungated" or selected populations are used to identify populations of interest based on each of the surface antigens recognized by the antibodies contained within each of the ClearLLab 10C Panels.

REAGENTS

The following multicolor cell tubes in a dry reagent are provided as ClearLLab 10C Panels. Each kit contains 25 total tests in 5 re-sealable pouches each with 5 tests:

- ClearLLab 10C B Cell Tube, PN B96805
Kappa-FITC/Lambda-PE/CD10-ECD/CD5-PC5.5/CD200-PC7/CD34-APC/CD38-AA700/CD20-AA750/CD19-PB/CD45-KrO
- ClearLLab 10C T Cell Tube, PN B96806
TCRγδ-FITC/CD4-PE/CD2-ECD/CD56-PC5.5/CD5-PC7/CD34-APC/CD7-AA700/CD8-AA750/CD3-PB/CD45-KrO
- ClearLLab 10C M1 Cell Tube, PN B96807
CD16-FITC/CD7-PE/CD10-ECD/CD13-PC5.5/CD64-PC7/CD34-APC/CD14-AA700/HLA-DR-AA750/CD11b-PB/CD45-KrO
- ClearLLab 10C M2 Cell Tube, PN B96808
CD15-FITC/CD123-PE/CD117-ECD/CD13-PC5.5/CD33-PC7/CD34-APC/CD38-AA700/HLA-DR-AA750/CD19-PB/CD45-KrO

STATEMENT OF WARNINGS



Safety Data Sheet is available at
beckman.com/techdocs.

1. These reagents contain 0.1% sodium azide and are in dried down format. Do not handle the reagent tubes without Personal Protective Equipment (PPE).
2. Specimens, samples, and all material coming in contact with these reagents should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.
3. Never pipette by mouth and avoid contact of samples with skin and mucous membranes.
4. Do not use reagent beyond the expiration date on the vial label.
5. Do not store the tubes in the refrigerator; do not freeze/thaw the tubes.
6. Minimize light exposure to the tubes prior to use, during sample preparation, and after sample processing prior to acquisition on the flow cytometer.
7. Use Good Laboratory Practices (GLP) when handling reagents.
8. Follow the recommended procedures to achieve optimal results.
9. Review all histograms before reporting results.
10. Avoid microbial contamination of reagent or erroneous results may occur.

STORAGE CONDITIONS AND STABILITY

Store the reagent tubes between 18°C and 30°C, protected from moisture and direct exposure to light. Refer to the kit label for the expiration date of the reagent. After opening the pouch, the remaining unused tubes and the desiccant bag must be resealed within the pouch and stored as directed above for up to 30 days.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any damage to the panel tube may indicate product deterioration and the product should not be used. Please contact your local Beckman Coulter Representative.

REAGENT PREPARATION

No preparation is necessary. The ClearLLab 10C Panels are ready to use in a dry unitized format.

SPECIMEN COLLECTION

- Each flow cytometric analysis requires 100 µL of whole blood, bone marrow, or single lymphoid cell suspension prepared from lymph node.
- Avoid contamination of the tops and sides of the test tubes with blood or bone marrow, as incomplete lysis may occur.
- Staining may be performed on specimens with white blood cell counts in the range of 3-20 x 10³ cells/µL.
- White blood cell counts exceeding 20 x 10³ cells/µL require dilution.
- White blood cell counts below 3 x 10³ cells/µL require centrifugation and resuspension to concentrate prior to sample preparation.
- Whole blood or bone marrow specimens may be collected using K₂EDTA, Heparin, or ACD anticoagulants as appropriate for the specimen.



- The specimens may be stored between 4°C and 25°C up to 24 hours for specimens collected in K₂EDTA and up to 48 hours for specimens collected in Heparin or ACD.
- For detailed information on the collection of whole blood by venipuncture and interfering conditions, refer to "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3), Approved Edition" published by the Clinical and Laboratory Standards Institute.

LIMITATIONS

1. All red blood cells may not lyse under the following conditions: nucleated red blood cells, abnormal protein concentration, or hemoglobinopathies. This may cause falsely decreased results as measured by % recovery due to unlysed red blood cells being counted as leukocytes.
2. Abnormal states of health are not always represented by abnormal percentages of certain leukocyte populations. An individual in an abnormal state of health may show the same leukocyte percentages as a healthy person. It is recommended to use test results in conjunction with clinical and other diagnostic data.
3. Certain patients may present unique problems due to altered or very low numbers of certain cellular populations.
4. Results obtained with flow cytometry may be erroneous if the laser is misaligned or the gates are improperly set.
5. Minimize the possibility of less than optimal results by analyzing stained cells promptly.
6. The reagents are for flow cytometry use only.
7. In patients treated with anti-human monoclonal antibody therapies, detection of the specific targeted antigens may be diminished or absent due to partial or complete blocking by the treatment antibody.⁹⁻¹¹
8. Prolonged exposure of cells to lytic reagents may cause white blood cell destruction and loss of cells in the population of interest.

MATERIALS REQUIRED

ClearLab 10C B Cell Tube [REF](#) B96805 – 25 tests
 ClearLab 10C T Cell Tube [REF](#) B96806 – 25 tests
 ClearLab 10C M1 Cell Tube [REF](#) B96807 – 25 tests
 ClearLab 10C M2 Cell Tube [REF](#) B96808 – 25 tests

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

IOTest 3 Lysing Solution, PN A07799
 IOTest 3 Fixative Solution, PN A07800
 Blood collection tubes with anticoagulant (K₂EDTA, ACD, or Heparin recommended)
 Heat Inactivated Fetal Calf Serum
 Phosphate Buffered Saline (PBS) Buffer
 Transfer pipette
 Micropipettors
 15 mL and/or 5 mL conical tubes
 Vortex mixer
 Centrifuge
 Navios Flow cytometer, 3 Lasers, PN A52103
 Navios EX flow cytometer, 3 Lasers, PN B80910
 Flow-Check Pro Fluorospheres PN A63493
 Flow-Set Pro Fluorospheres PN A63492
 Cotton tip applicator
 ClearLab Compensation Kit, PN B74074
 ClearLab Compensation Beads, PN B99883
 ClearLab Control Cells Normal, PN B90002
 ClearLab Control Cells Abnormal, PN B90003
 Kaluza C Software PN C10574

PROCEDURE

Preparation of Reagents

1. **1X IOTest 3 + 0.25% Fixative Lyse Solution (prepared daily and used within 3 hours after preparation)**
 - a. Prepare a sufficient volume of 1X IOTest 3 Lysing Solution by diluting the 10X stock in deionized water (1:9 v/v Lyse/Water). Mix thoroughly.
 - b. Prepare a sufficient volume of 1X IOTest 3 + 0.25% Fixative Lysing Solution by diluting 31.25 µL of the IOTest 3 Fixative Solution at its 10X concentration in 1 mL of prepared 1X IOTest 3 Lysing Solution. Mix thoroughly.
2. **PBS/2% Fetal Calf Serum (FCS) Wash Buffer (Prepared daily)**
 - a. Prepare a sufficient volume of PBS solution with 2% heat inactivated FCS for use as the wash buffer (1:50 v/v FCS/PBS).

SAMPLE PREPARATION

Both blood and bone marrow specimens are washed prior to sample staining to avoid plasma/serum protein interferences, providing a single methodology for use with all ClearLab 10C Panels. Optimal washing efficiency is obtained when 3 sequential washing steps are performed with about 30 volume wash buffer excess of sample volume for each step. Based on the individual laboratory workflow, specimens can be washed using a bulk wash procedure or single tube wash procedure. RBC lysis is followed after the antibody staining. Whole blood and bone marrow specimens collected with K₂EDTA must be prepared within 24 hours of collection. Prepared samples are stable for 5 hours prior to analysis when stored at 20-25°C. Whole blood and bone marrow specimens collected with Heparin or ACD must be prepared within 48 hours of collection. Prepared samples are stable for 5 hours prior to analysis when stored at 20-25°C. Prepared samples of the single cell suspensions prepared from lymphoid tissues are stable for 5 hours prior to analysis.

NOTE: Single cell suspensions prepared from lymphoid tissues may not require washing prior to staining if the specimen was washed during the disaggregation process. If washing steps were not performed for removal of residual soluble proteins, or if the cells were resuspended into a buffer containing human serum or serum proteins, then pre-washing is necessary. Follow your laboratory procedure for washing.

CAUTION: Failure to follow the washing instructions (volumes and wash cycles) may cause erroneous results.

Bulk Wash and Sample Staining Procedure

1. Obtain WBC count of the sample to ensure the counts are within the limits of the assay (of 3-20 x 10³ cells/µL).



- To a 15 mL conical tube, dispense 450 μ L of the specimen.

NOTE: Mark the 450 μ L line on the tube to help with the later steps.

- Add 12 mL of PBS/2% FCS Wash Buffer. Cap and mix by inverting the tubes.
- Centrifuge the tubes at 300 x g for 5 minutes and discard the supernatant by aspiration.
- Repeat steps 3 and 4, two more times.
- After the last wash, resuspend the pellet in PBS/2% FCS to the initial 450 μ L volume using the Wash Buffer.
- Aliquot 100 μ L of the washed sample to each dry reagent tube and vortex vigorously for 6-8 seconds. Incubate at 20-25°C for 15 minutes, protected from light.
- Add 2 mL of 1X IOTest3 Lyse + 0.25% Fix solution to each tube. Mix by vortexing sample for 5 seconds and incubate at 20-25°C for 10-15 minutes, protected from light.
- Centrifuge at 300 x g for 5 minutes. Discard the supernatant by aspiration.
- Vortex to loosen the pellet and add 3mL of PBS to the sample.
- Centrifuge at 300 x g for 5 minutes. Discard the supernatant by aspiration.
- Resuspend the sample in 500 μ L of PBS. Vortex to mix.
The sample is now ready for acquisition.

Single Tube Wash and Sample Staining Procedure

- To a 5 mL conical tube, dispense 100 μ L of the specimen.

NOTE: Mark the 100 μ L line on the tube to help with the later steps.

- Add 3 mL of PBS/2% FCS Wash Buffer. Cap and mix by gentle inversion.
- Centrifuge the tubes at 300 x g for 5 minutes and discard the supernatant by aspiration.
- Repeat steps 2 and 3, two more times.
- After the last wash, adjust the volume to the initial 100 μ L using the Wash Buffer.
- Transfer the 100 μ L washed sample to the dry reagent tube and vortex vigorously for 6-8 seconds. Incubate at 20-25°C for 15 minutes, protected from light.
- Add 2 mL of 1X IOTest3 Lyse + 0.25% Fix solution to each tube. Mix by vortexing sample for 5 seconds and incubate at 20-25°C for 10-15 minutes, protected from light.
- Centrifuge at 300 x g for 5 minutes. Discard the supernatant by aspiration.
- Vortex to loosen the pellet and add 3mL of PBS to the sample.
- Centrifuge at 300 x g for 5 minutes. Discard the supernatant by aspiration.
- Resuspend the sample in 500 μ L of PBS. Vortex to mix.
The sample is now ready for acquisition.

QUALITY CONTROL

- Ensure the flow cytometer is properly aligned according to the manufacturers recommendations (refer to Navios and Navios EX Instrument Manual for specific instructions). Run Flow-Check Pro Fluorospheres daily to verify instrument alignment (refer to product Instructions for Use).
- The instrument is standardized to the established Flow-Set Pro target values and a compensation matrix is established by following the instructions detailed in the ClearLLab 10C System Guide. Daily QC is run before the sample acquisition.

NOTE: For instrument setup and daily QC of Navios and Navios EX for use with the ClearLLab 10C Application, refer to the ClearLLab 10C System Guide (PN C24688).

FLOW CYTOMETRY SAMPLE ACQUISITION AND ANALYSIS INSTRUCTIONS

CAUTION: If the laser on the flow cytometer is misaligned or inappropriate filters are present or the gates are improperly set, results may be erroneous.

- Follow steps in QUALITY CONTROL to setup the Navios and Navios EX instruments.
- Samples are acquired by applying the Cytosettings from the Quality Control.
- Refer to the ClearLLab 10C System Guide (PN C24688) for the Gating Strategy and Data Analysis using Kaluza C Software.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS





Refer to the ClearLLab 10C System Guide (PN C24688) for information on Diagnostic Accuracy, Precision, Detection Capability and Specificity.



REFERENCES

1. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry, *Cytometry* 2007 72B:S14-22.
2. WHO 2008 Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th Edition, 2008, IARC Press.
3. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ and Davis BH. 2001. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: Results of an international consensus meeting. *Cytometry*, 46:23-27.
4. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: recommendations for training and education to perform clinical flow cytometry. Greig B, Oldaker T, Warzynski M, Wood B. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S23-33.
5. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S14-22.
6. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, Gorczyca W, Lee R, Maiese R, Orfao A, Wells D, Wood BL, Stetler-Stevenson M. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S5-13.
7. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S3.
8. Stetler-Stevenson, et al. "Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline – Second Edition", April 2007, H43-A2, Vol. 27, No. 11.
9. Cosimi AB, Colvin RB, Burton RC, Rubin RH, Goldstein G, Kung PC, Hansen WP, Delmonico FL and Russell PS. 1981. Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N. Engl. J. Med.*, 305:308-314.
10. Kaufman A, Herold KC. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009 May; 25(4):302-6.
11. Frankel AE, Zuckero SL, Mankin AA, Grable M, Mitchell K, Lee YJ, Neville DM, Woo JH. Anti-CD3 recombinant diphtheria immunotoxin therapy of cutaneous T cell lymphoma. *Curr Drug Targets.* 2009 Feb; 10(2):104-9.
12. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. 1984. *Leukocyte Typing*. New York: Springer-Verlag. p. 26, 28, 41-2, 196, 01, 215-216.
13. McMichael AJ, ed. *Leukocyte Typing III*. Oxford: Oxford University Press, 1987, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 202, 206, 302-308, 315, 475, 796-801.
14. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. *Leukocyte Typing V*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1995, Vol. 1. pp. 262, 263, 268, 270, 507-511; Vol. 2. pp. 1398-1400.
15. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Samoza C, Williams AF eds. *The Leucocyte Antigen Facts Book*. London: Academic Press, 1993, pp. 106-109.
16. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, and Bernstein ID. *Leukocyte Typing II*. New York: Springer-Verlag, 1986, Vol 2: pp 8, 15-25, 37.
17. Zola H, Swart B, Nicholson I and Voss E. *Leukocyte and Stromal Cell Molecules: The CD Markers*. Wiley-Liss, 2007.
18. Craig FE and Foon KA. Flow cytometric Immunophenotyping for Hematologic Neoplasms. 2008, *Blood*, 111:8, 3941-3967.
19. Wood B, Jevremovic D, Béné MC, Yan M, Jacobs P and Litvin V. Validation of Cell-Based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS – Part V - Assay performance Criteria. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, pp. 315-323.
20. Kerr MA and Craig Stocks S. 1992. The role of CD15-(Lex)-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *Histochem. J.*, 24, 811- 826.
21. Arber DA and Weiss LM. 1993. CD15: A review. *Appl. Immunohistochem.*, 1, 17-30.
22. Ravetch JV and Perussia B. 1989. Alternative membrane forms of FcγRIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. *J. Exp. Med.*, 170, 481-497.
23. Huizinga, T.W.J., Roos, D., von dem Borne, A.E.G. Kr. 1990. Neutrophil Fcγ receptors: A two-way bridge in the immune system. *Blood*, 75, 1211-1214.
24. Sperling C, Schwartz S, Büchner T, Thiel E and Ludwig WD. 1997. Expression of the stem cell factor receptor c-kit (CD117) in acute Leukemias. *Haematologica*, 82, 617-621.
25. Uoshima N, Ozawa M, Kimura S., Tanaka, K., Wada K, Kobayashi Y and Kondo M. 1995. Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *Br. J. Haematol.*, 91, 30-36.
26. Escribano L, Ocqueteau M, Almeida J, Orfao A and San Miguel JF. 1998. Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk. Lymphoma*, 30, 459-466.
27. Todd III RF, Nadler LM and Schlossman SF. 1981. Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 126, 1435-1442.
28. Todd RF, van Aghoven A, Schlossmann SF and Terhorst C. 1982. Structural analysis of differentiation antigens Mo1 and Mo2 on human monocytes. *Hybridoma*, 1, 329-337.
29. Lee J and Dupont BO. 1990. The HLA system: An introduction. *The HLA system: A new approach*, Springer-Verlag, 1-26.
30. Uckun FM. 1990. Regulation of human B-cell ontogeny. *Blood*, 76, 1908-1923.
31. Huang S and Terstappen LWMM. 1994. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLADR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood*, 83, 1515-1526.
32. Kontny E and Ryzewska A. 1990. Surface markers on human activated T lymphocytes IV. Comparison of high-affinity E-rosette receptor expression with the expression of other activation markers (receptor for Interleukin 2, MHC class II (antigens). *Archivum Immunologiae et Ther. Experimentalis*, 38, 421-431.
33. Pierelli L, Teopili L, Menichella G, Rumi C, Paolini A, Iovino S, Puggioni PL, Leone G and Bizzi B. 1992. Further investigations on the expression of HLA-DR, CD33 and CD13 surface antigens in purified bone marrow and peripheral blood CD34+ haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.*, 83, 1-7.
34. Wong KK1, Khatri I, Shaha S, Spaner DE, Gorczynski RM. 2010. The role of CD200 in immunity to B cell lymphoma. *J Leukoc Biol.* 2010 Aug;88(2):361-72.
35. SHIANG HUANG, ZHANG CHEN, JI FENG YU, DENNIS YOUNG, ASAD BASHEY, ANTHONY D. HO, PING LAW. 1999. Correlation Between IL-3 Receptor Expression and Growth Potential of Human CD34+ Hematopoietic Cells from Different Tissues. *Stem Cells* 1999;17:265-272.
36. Keqiang Liu, Mengru Zhuc, Yao Huang, Shuhua Wei, Jingli Xie, Yechen Xiao. 2015. CD123 and its potential clinical application in leukemias. *Life Sciences* 122 (2015) 59–64.
37. J. A. Bluestone, R. Khattri, R. Sciammas, and A. I. Sperling. 1995. TCRγo CELLS: A Specialized T-Cell Subset in the Immune System,
38. F. Nimmerjahn and J. V. Ravetch, "Fcγ receptors: old friends and new family members," *Immunity*, vol. 24, no. 1, pp. 19–28, 2006.
39. S. Radaev and P. Sun, "Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors," *Molecular Immunology*, vol. 38, no. 14, pp. 1073–1083, 2002.
40. Ziegler-Heitbrock L. 2007. The CD14+CD16+ Blood Monocytes: Their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 81: 584-592.

PRODUCT AVAILABILITY

ClearLab 10C B Cell  B96805 – 25 tests
ClearLab 10C T Cell  B96806 – 25 tests
ClearLab 10C M1 Cell  B96807 – 25 tests
ClearLab 10C M2 Cell  B96808 – 25 tests

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

Texas Red®-X is a trademark of Molecular Probes, Inc.

May be covered by one or more pat. – see www.beckman.com/patents.

For additional information, or if damaged product is received, call Beckman Coulter Customer Service at 800-742-2345 (USA or Canada) or contact your local Beckman Coulter Representative.



For a patient/user/third party in the European Union and in countries with identical regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on In vitro Diagnostic Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorized representative and to your national authority.

The summary of safety and performance is to be located at beckman.com/techdocs.

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (PN C05838).



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland 353 (0)65 683 1100
www.beckman.com

© 2020 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision History

Revision AC, 05/2019

Changes were made to:

- Add new languages

Revision AD, 01/2020

Changes were made to:

- Add new languages

Revision AE, 06/2020

Changes were made to:

- IVDR updates
- Add new languages



DuraClone RE ALB Tube, 25 Tests, RUO

REF C00163 – 25 tests

IFU- C00163-1.0



	Specifications of Constituent 1	Specifications of Constituent 2	Specifications of Constituent 3	Specifications of Constituent 4	Specifications of Constituent 5	Specifications of Constituent 6	Specifications of Constituent 7
Specificity	CD58	CD34	CD10	CD19	CD38	CD20	CD45
Clone	AICD58	581	ALB1	J3-119	LS198-4-3	B9.E9 (HRC20)	J.33
Immunogen	PHA blasts	Human CD34+ cells	Human Leukemia cells	SKLY 18 lymphoma cells	Human T cell line HUT 78	DAUDI cell line (Human B Lymphoblastoid)	Laz 221 cell line
Isotype	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1
Species	Mouse						
Source	Ascites fluid or supernatant of in vitro cultured hybridoma cells.						
Purification	Affinity chromatography						
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	ECD	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Allophycocyanin Alexa Fluor 700 (APC-A700)	Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Krome Orange (KrO)
Excitation	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633/638 nm	405 nm
Emission	525 nm	613 nm	692 nm	770 nm	720 nm	775 nm	528 nm

**For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.**

BACKGROUND

Discrimination of abnormal from normal B cells during early stages of B cell development in human bone marrow can be realized through precise assessment of B cell surface antigen expression patterns. Normal and abnormal patterns in B cells can be defined by differential densities of CD10, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45 and CD58 expression on the surface of B cells.

Flow cytometry is a powerful method to assess these differences precisely and is capable to detect abnormal populations even at very low frequencies. While sensitivity depends heavily on numbers of acquired cells, specificity relies mainly on the discriminative power of the antibody combination used. The selected marker combination has been carefully optimized towards this end.

APPLICATION

The DuraClone RE ALB Tube, 25 Tests, RUO can be used to identify abnormal precursor B cells in human bone marrow samples post red blood cell lysis.

This reagent is intended to be used on a flow cytometer with features defined below:

- A 488 nm laser with detectors capable of measuring light scatter (forward and side) and fluorescence emission in the following ranges: 504-545 nm, 560 – 600 nm, 605 – 635 nm, 680 –710 nm and >755nm.
- A 638 nm laser with detectors capable of measuring fluorescence emission in the following ranges: 650-670 nm, 715-735nm and > 755 nm.
- A 405 nm laser with detectors capable of measuring detection of fluorescence emission in the following ranges: 430-470 nm and 530-570 nm.

PRINCIPLE

This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by immature B cells. Specific surface staining of the abnormal precursor cells is performed by incubating the sample with RE ALB Tube.

KIT CONTENTS

DuraClone RE ALB Tube, 25 Tests, RUO contains the following:

- 25 tests of the DuraClone RE ALB Tubes
- 3 Compensation Kits, each kit containing seven tubes, each of a single color; i.e.
 - CD4-FITC
 - CD34-ECD
 - CD10-PC5.5
 - CD19-PC7
 - CD38-APC-A700

- CD20-APC-A750
- CD8-Krome Orange

STATEMENT OF WARNINGS

1. For warranty information of DuraClone RE ALB Tube, 25 Tests, RUO refer to the Certificate of Analysis (COA). Discard reagent or compensation tubes, as per applicable regulations.
2. Do not store the reagent or compensation tubes in the refrigerator; do not freeze/thaw the tubes.
3. All blood and bone marrow samples must be considered as potentially infectious and must be handled with appropriate care (protective gloves, gowns and goggles must be used while handling blood samples).
4. Discard reagent and compensation tubes containing residual processed samples, as per applicable regulations
5. Minimize the exposure of the tubes to light, especially during incubation of sample(s) stained with fluorescent antibodies or during processing of sample(s), before acquisition.
6. Only calibrated instruments, as per the manufacturer's instructions, should be used.
7. Adhere to the instructions for use while using this reagent.
8. Ensure that the compensation tubes are run in the following order:
 - CD4-FITC
 - CD34-ECD
 - CD10-PC5.5
 - CD19-PC7
 - CD38-APC-A700
 - CD20-APC-A750
 - CD8-Krome Orange
9. Seal the zip lock of the pouch containing reagent tubes after removing the desired number of tests.
10. Reagent and compensation tubes must be stored within the sealed pouch containing desiccant packs to prevent the tubes from being exposed to moisture.

STORAGE CONDITIONS

Store the reagent and compensation tubes between 20 and 30°C, in a dry place protected from the direct exposure to light and moisture.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any damage to the panel tube may indicate product deterioration and the product should not be used. Please contact your local distributor or Beckman Coulter at the following email address: duraclone-support@beckman.com

INSTRUMENT REQUIREMENTS

This reagent is designed to be used on a flow cytometer such as *Navios, capable of detecting forward and side

scatter, and compatible with the emission spectra of the fluorochromes used in the reagent.

SPECIMEN COLLECTION

The bone marrow sample should be collected in a blood collection tube containing K₂ EDTA. Follow the collection tube manufacturer's guidelines for the minimum volume of blood to be collected. The sample must be stored between 18°C and 25°C.

For other anticoagulants, it is recommended that users verify the reagent performance for their specific applications.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Blood collection tube containing K₂ EDTA
- Calibrated pipettes
- Vortex mixer
- Sheath fluid
- Flow-Check Pro Fluorospheres (REF. A69183) (For Navios alignment verification)
- Flow-Set Pro Fluorospheres (REF. A69184) (For Navios standardization)
- VersaComp Antibody Capture Beads Kit [Positive Bead] (REF B22804)
- Versalyse Lysing solution (REF. A09777)
- 10X IOTest3 Fixative solution (REF. A07800) (8% formaldehyde solution)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (1X)
- Flow cytometer

The sample preparation procedure and compensation setup mentioned in the sections below are for reference purposes only. It may be necessary for users to adapt the protocol as per their specific applications.

PROCEDURE

SAMPLE PREPARATION (Example)

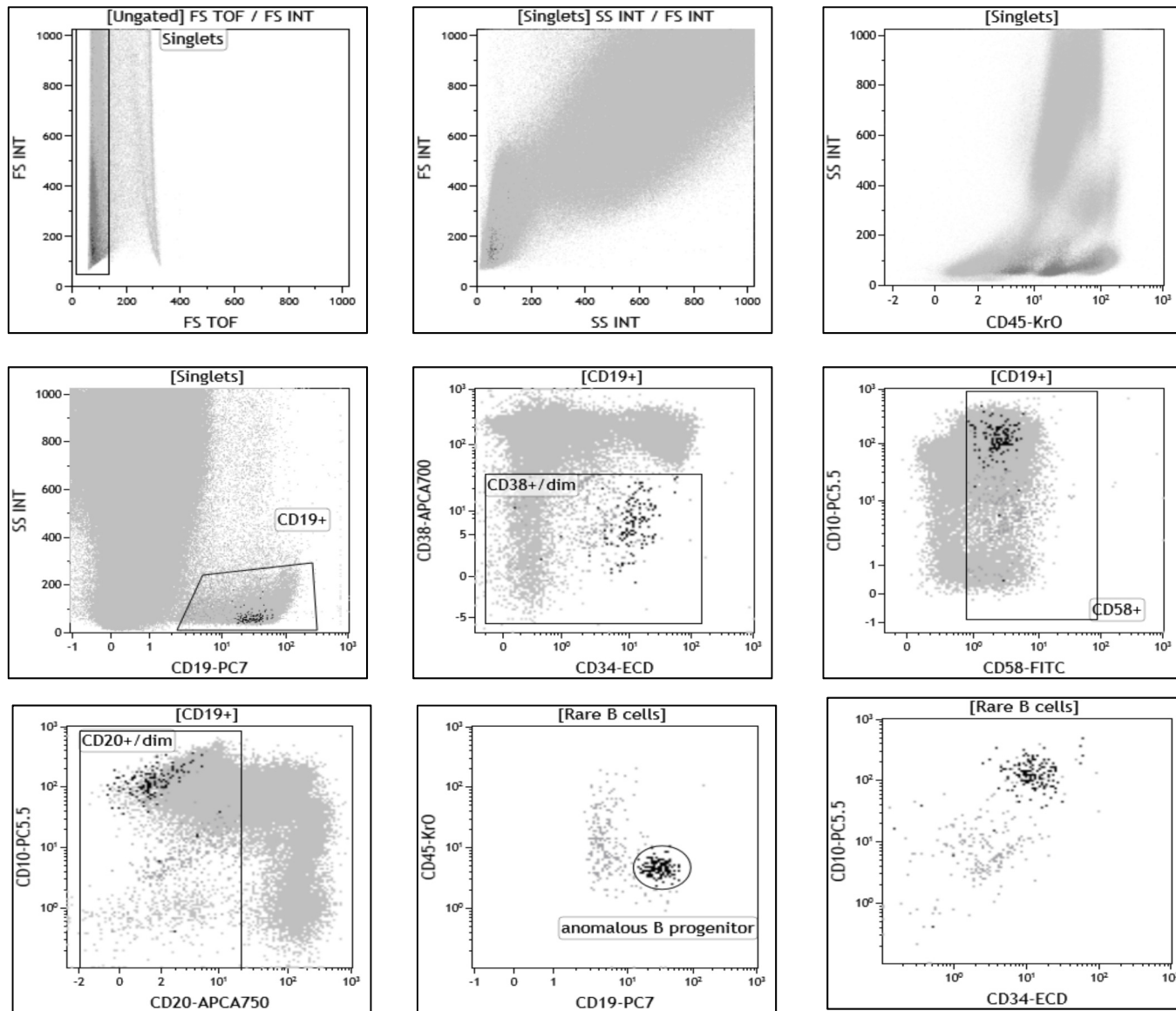
1. Determine the total number of leukocytes in the bone marrow (BM) sample.
2. Transfer the volume of BM equivalent to 1.5 to 2.0 million leukocytes to an empty tube.
3. Add 2 mL of Versafix (2mL of VersaLyse containing 50 µL of 10X IOTest 3 fixative) per 100 µL of BM cells, vortex on high for 1-3 seconds and incubate for 15 minutes at ambient temperature (18-25°C).
4. Centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet. Resuspend the pellet with 100 µL of PBS.
5. Transfer the resuspended cells to the DuraClone RE-ALB tube. Vortex vigorously for at least 6-8 seconds and incubate for 15 minutes at ambient temperature (18-25°C).
6. Add 3ml of PBS. Centrifuge 5 minutes at 200 x g.
7. Resuspend the pellet with 500 µL of 1X PBS containing 6.25 µL of 10X IOTest 3 fixative solution.

COMPENSATION SETUP (Example)

- Pipette 800µL of fresh whole blood into an empty polypropylene tube.
- Add 2 ml of Versafix (2 mL of VersaLyse containing 50µL of 10X IOTest 3 fixative) per 100µL of whole blood. Vortex on high for 1-3 seconds and incubate for 15 minutes at laboratory conditions (18-25°C).
- Centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet.
- Add 3 mL of 1x PBS, centrifuge the tube at 300 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant and vortex the tube. Resuspend the pellet with 800 µL of 1x PBS.
- Transfer 100 µL of cell suspension into each of the seven compensation tubes.
- Add one drop of the positive VersaComp antibody capture beads to the following compensation tubes:
 - CD34-ECD compensation tube
 - CD10-PC5.5 compensation tube
 - CD19-PC7 compensation tube
 - CD38-APC-A700 compensation tube
 - CD20-APC-A750 compensation tube
- Vortex at high speed for 6-8 seconds and incubate for 15 minutes at ambient temperature (18 - 25°C), protected from direct light.
- Add 3 mL of 1x PBS. Centrifuge the tubes at 300 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellets.
- Re-suspend the pellet in each tube in 500 µL of 1X PBS containing 6.25 µL of 10X IOTest 3 fixative solution.
- For Compensation setup on Navios:
 - For setting up compensation using Auto Setup Scheduler, refer to the Application Note "Compensation Setup for High Content DuraClone reagents", downloadable from the Beckman Coulter website: <http://www.beckman.com/coulter-flow-cytometry/duraclone-im>
- For all other flow cytometer users, follow the instrument manufacturer instructions for compensation setup.

SAMPLE ANALYSIS (Example)

The below illustrative example displays identification of rare B cell events in bone marrow sample spiked with whole blood, stained with Duraclone RE ALB Tube and acquired based on the features available on the Navios Flow Cytometer. Additional gates can be applied based on user requirements.



Gate	Logic
CD19+	CD19+ AND Singlets
CD45+	CD45+ AND Singlets
Rare B cells	CD38+/dim AND CD19+ AND Singlets AND CD20+/dim AND CD58+
anomalous B progenitor	"anomalous B progenitor" AND CD38+/dim AND CD19+ AND Singlets AND CD20+/dim AND CD58+


1. Create an appropriate acquisition - analysis protocol to define the population gates and a series of dual parameter plots for analysis.
2. Create a FS INT vs FS TOF dot plot and a singlet gate to eliminate any doublets (identified by higher values on FS TOF)
3. Create a FSC vs. SSC dot plot and apply the singlets gate. Set the discriminator on the FS parameter to a value low enough to assure lymphocytes are not excluded from acquisition.
4. Create a CD45-KrO vs. SSC dot plot and apply the scatter gate.
5. Create a CD19-PC7 vs. SSC dot plot. Draw a region to surround the CD19+ low SSC cells.
6. Create a CD34-ECD vs CD38-AA700 dot plot and apply the gate from step 5. Create a region to encompass the CD38 AA700 dim/-ve+ CD34+ cells.
7. Create a CD10-PC5.5 vs CD20-AA750 dot plot and apply the gate from step 5. Create a region to encompass the CD20 AA750 dim/-ve+ CD10+ cells
8. Create a CD10-PC5.5 vs CD58-FITC dot plot and apply the gate from step 5. Create a region to encompass the CD58+ CD10+ cells.
9. Create a Boolean AND gate which encompass all the gates from step 6, 7 and 8. Label the Boolean gate as "Rare B cells".
10. Create a CD45 KrO vs CD19-PC7 dot plot and apply the "Rare B cells" gate. Draw a gate on CD19+ CD45 dim population and label the gate as "Anomalous B progenitors".
11. Create a CD10-PC5.5 vs CD34-ECD dotplot. Apply the gate "Anomalous B progenitors" on to this plot.
12. Use the above gates to analyze the Immuno phenotype expression of the markers on the gated CD34+ CD38+ CD10+ CD58+ B cells.

REFERENCES

1. Tucker W. LeBien and Thomas F. Tedder. "B lymphocytes: how they develop and function". BLOOD, 1 Sep. 2008 Vol. 112, No. 5.
2. Tucker W. LeBien. "Fates of human B-cell precursors". BLOOD, 1 July. 2000. Vol. 96, No 1.
3. McKenna, RW. Washington, LT., Aquino, DB. Picker, LJ, Kroft SH. "Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry". 2001, Blood. 98, 2498-2507.
4. Le Bien TW, WÖrmann B, Villablanca JG, Law CL, Steinberg LM, Shah VO, Loken MR. "Multi parameter flow cytometric analysis of fetal bone marrow B cells". Leukemia. 1990. 4(5): 354-358.
5. Mehta, K., Shahid, U. Malavasi, F. "Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions" FASEB J., 1996. 10, 1408-1417.

PRODUCT AVAILABILITY

DuraClone RE ALB Tube, 25 Tests, RUO

 C00163

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

*Navios is CE marked for 10-color in vitro diagnostic (IVD) use. In the U.S.A., Navios is intended for use as an IVD device for immunophenotyping with Navios tetra software and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 reagents. All other uses are for research use only (RUO).

Immunotech and the Immunotech product marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Immunotech SAS in the United States and other countries. Immunotech is a Beckman Coulter company. Alexa Fluor is a trademark of Molecular Probes, Inc.

For additional information, or if a damaged product is received, email Beckman Coulter Customer Service at duraclone-support@beckman.com, or contact your local Beckman Coulter Representative.



Beckman Coulter India Pvt. Ltd.
50-B, II Phase, Peenya Industrial Area, Peenya,
Bangalore 560058, India

Printed in India

© 2016 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision 1.0, November 2016

■ Initial Release


Flow-Check Pro Fluorospheres

REF A63493 - 3 x 10 mL

PN A70450-AN



STATEMENT OF WARNINGS

	WARNING
reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) <0.05%	
May cause an allergic skin reaction.	
Harmful to aquatic life with long lasting effects.	
Avoid release to the environment.	
Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.	
If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.	
Take off contaminated clothing and wash it before use.	
SDS	Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs .

Flow Cytometer Alignment Verification

For In Vitro Diagnostic Use

Rx Only in the U.S.A.

INTENDED USE

Flow-Check Pro Fluorospheres is a suspension of fluorescent microspheres used for daily verification of the Navios, Navios EX or Cytomics FC 500 Flow Cytometer optical alignment and fluidics system.

INTENDED USER

This product is intended for laboratory professional use.

SUMMARY AND EXPLANATION

In flow cytometric analysis, optical and fluidics systems are aligned to maximize the detection of fluorescence and scatter signals. The use of uniform fluorospheres to verify optical alignment has been well established.¹⁻³ Flow-Check Pro is a mixture of three different types of fluorospheres, each with a uniform and stable size and fluorescence intensity. The uniformity of these product parameters allows for adjustment and/or verification of the alignment of the optical and fluidics systems of flow cytometers.

REAGENTS

Flow-Check Pro Fluorospheres
REF A63493 - 3 x 10 mL

REAGENT CONTENTS

Flow-Check Pro Fluorospheres consists of a mixture of 10 µm fluorospheres with a fluorescence emission of 515 to 800 nm when excited at 488 nm, 6 µm fluorospheres with a fluorescence emission of 640 to 800 nm when excited at 635 nm, and 3 µm fluorospheres with a fluorescence emission of 400 to 500 nm when excited at 405 nm, respectively. The mixture is suspended in an aqueous medium containing surfactants and preservatives at a total concentration of 2 x 10⁶ fluorospheres/mL (nominal concentration).

1. This product should only be used in its suspension medium. Addition of organic solvents or high ionic strength solutions may irreversibly swell or aggregate fluorospheres.
2. Fluorospheres will settle over extended periods. Ensure the fluorospheres are completely resuspended before use.
3. Do not use fluorospheres beyond the expiration date on the vial label.
4. Use Good Laboratory Practice (GLP) when handling this reagent.
5. Do not aspirate fluorospheres directly from the vial. Aspirate fluorospheres from a test tube.

STORAGE CONDITIONS AND STABILITY

This reagent is stable to the expiration date on the vial label when stored at 2-8°C. Do not freeze. Minimize exposure to light. Open vial stability is 65 days. Open vials must be refrigerated after use.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Inability to obtain expected results may indicate product instability or deterioration. The presence of a bimodal peak is not necessarily indicative of product deterioration. Refer to the appropriate Instrument Manuals for performance specifications and determining expected results.

REAGENT PREPARATION

No preparation is necessary. Flow-Check Pro Fluorospheres is used directly from the vial with no dilution. Proper mixing is required prior to use.

PROCEDURE

MATERIAL SUPPLIED

Flow-Check Pro Fluorospheres
REF A63493 - 3 x 10 mL

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Appropriately sized test tubes
Flow cytometer
Vortex Mixer

Procedure for Daily Verification of Alignment and Fluidics

NOTE: Where the Cytomics FC 500 Flow Cytometer product labeling and software denotes Flow-Check, Flow-Check 675 and/or Flow-Check 770 Fluorospheres, Flow-Check Pro Fluorospheres may be used as an alternative product.

Performance characteristics for use with the two laser colinear excitation configurations have not been established.

1. Use the filter set recommended by the manufacturer for detecting the appropriate fluorescence parameters (refer to Instrument Manuals).
2. Schedule the appropriate Alignment Application. Refer to the instrument IFU for details on scheduling Applications. Alternatively, if a manual protocol is preferred, create a Flow-Check Pro Fluorospheres test protocol containing histograms for FS and each desired linear fluorescence parameter. Create a gate region FCblue that encompasses the 10 µm beads. Assign that gate to the linear fluorescence histograms which correspond to the blue (488 nm) laser channels. Create a gate region FCred that encompasses the 6 µm beads. Assign that gate to the linear fluorescence histograms which correspond to the red (635 nm) laser channels. Create a gate region FCviolet that encompasses the 3 µm beads. Assign that gate to the linear fluorescence histograms which correspond to the violet (405 nm) laser channels. Create a linear region within each histogram. Set color compensation to zero (0) percent for all fluorescence compensations. Set a stop on 5,000 gated events (see Figure 1), and ensure the Flow Rate is set to low.
3. Vigorously mix the Flow-Check Pro Fluorospheres vial.
4. Dispense 15-20 drops (about 0.5 mL) of Flow-Check Pro Fluorospheres into a test tube.

IMPORTANT: TO AVOID CONTAMINATION AND DEGRADATION, DO NOT ASPIRATE DIRECTLY FROM THE VIAL.

5. Vortex the test tube, place in the MCL carousel, and initiate the run.
6. Adjust the Forward Scatter voltage, gain and discriminator to ensure the bead populations are visible on the forward scatter plot. Adjust the fluorescence detector settings to place the populations mid-scale.
7. Record the HPCV and peak position for each desired parameter.

NOTE: For forward scatter channel record only FCblue (10 µm) HPCV values.

8. Record the daily HPCV values for each desired parameter on its respective Levey-Jennings graph.

NOTE: Flow-Check Pro Fluorospheres may be added to the QC Products (Report Generator Edit Products screen) following instructions in the Online Help. Once added as a QC Product, the Flow-Check Pro protocol regions may be selected for QC export in the Regions Properties dialog. Refer to the CXP Online Help for instructions on how to set up QC Regions for export to the Report Generator Levey-Jennings plots.

NOTE: When running BCI AutoSetup Flow-Check Pro protocols, the PASS/FAIL criteria observed at the end of acquisition represents HPCVs exceeding the upper limit defined in the protocol's region name. Review the QC Levey-Jennings data.

9. Repeat steps 1-8 following instrument start up.

NOTE: Any existing Flow-Check Fluorospheres alignment protocol or alignment protocol created by the CXP Application Definition Wizard that will be used for Flow-Check Pro Fluorospheres must have the protocol saved with regions, region names and gate assignments modified to ensure that QC results are tracked appropriately. Refer to Figure 2 for protocol setup requirements, and the CXP Online Help for details on editing regions and gate assignments.

10. Refer to the troubleshooting section when results fall outside expected limits.



LIMITATIONS

1. Flow-Check Pro Fluorospheres analyzed at increased flow rates may exhibit wider population distributions and a higher HPCV.
2. Day to day analysis of Flow-Check Pro Fluorospheres should be conducted using the same peak positions determined in Procedure for Daily Verification of Alignment and Fluidics.
3. Performance characteristics for use with the two laser co-linear excitation configurations have not been established.

TROUBLESHOOTING

1. Ensure that the fluorospheres sample has not been diluted or contaminated. Dilution of Flow-Check Pro Fluorospheres may increase the HPCV values recovered.
2. Ensure the Flow-Check Pro Fluorospheres has been adequately mixed.
3. Check for bubbles in the sheath filter. Review histogram patterns to check for a clog. If a clog or bubble is suspected, flush or prime the sample line.
4. Refer to Instrument Manuals for additional troubleshooting steps.

EXPECTED RESULTS

Performance specifications by instrument platform:

Cytomics FC 500

Forward Scatter: The HPCV of the linear integral signal intensity values using Flow-Check Pro Fluorospheres is <2%.

Fluorescence: The HPCV of the linear integral signal intensity values using Flow-Check Pro Fluorospheres is <2% for FL1-FL4 and <2.5% for FL5 from the Argon laser.

Navios, Navios EX

Forward Scatter: The HPCV of the linear integral signal intensity values using Flow-Check Pro Fluorospheres is <2% from 488 nm excitation.

Fluorescence: The HPCV of the linear integral signal intensity values using Flow-Check Pro Fluorospheres is <2% for FL1-FL4 and <2.5% for FL5 from 488 nm excitation, <3.0% for FL6-FL8 from the red laser and <4.0% for FL9-FL10 from the violet laser.


Expected results may vary slightly due to instrument differences such as color filters, laser power, laser emission wavelength, laser mode, flow cell type, sample delivery rate, and statistical analysis package.

REFERENCES

1. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline-Second Edition. 2007. CLSI document H42-A2.
2. Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping: A Report From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. 1993. Cytometry 14:702-715.
3. 1994 Revised Guidelines for the Performance of CD4+ T-Cell Determinations in Persons with Human

Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. 1994. Mortality and Morbidity Weekly Report (MMWR). 43:7-8.

PRODUCT AVAILABILITY

Flow-Check Pro Fluorospheres
 A63493 - 3 x 10 mL vials

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

May be covered by one or more pat. – see www.beckman.com/patents

For additional information, or if damaged product is received, call Beckman Coulter Customer Service at 800-742-2345 (USA or Canada) or contact your local Beckman Coulter Representative.

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (PN C05838).



Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland
www.beckman.com

© 2019 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision History

Revision AL, 06/2018

Changes were made to:

- Add new languages

Revision AM, 11/2018

Changes were made to:

- Add new languages

Revision AN, 10/2019

Changes were made to:

- INTENDED USER
- STATEMENT OF WARNINGS



Figure 1. Flow-Check Pro Fluorospheres sample histograms for a ten-color three laser system.

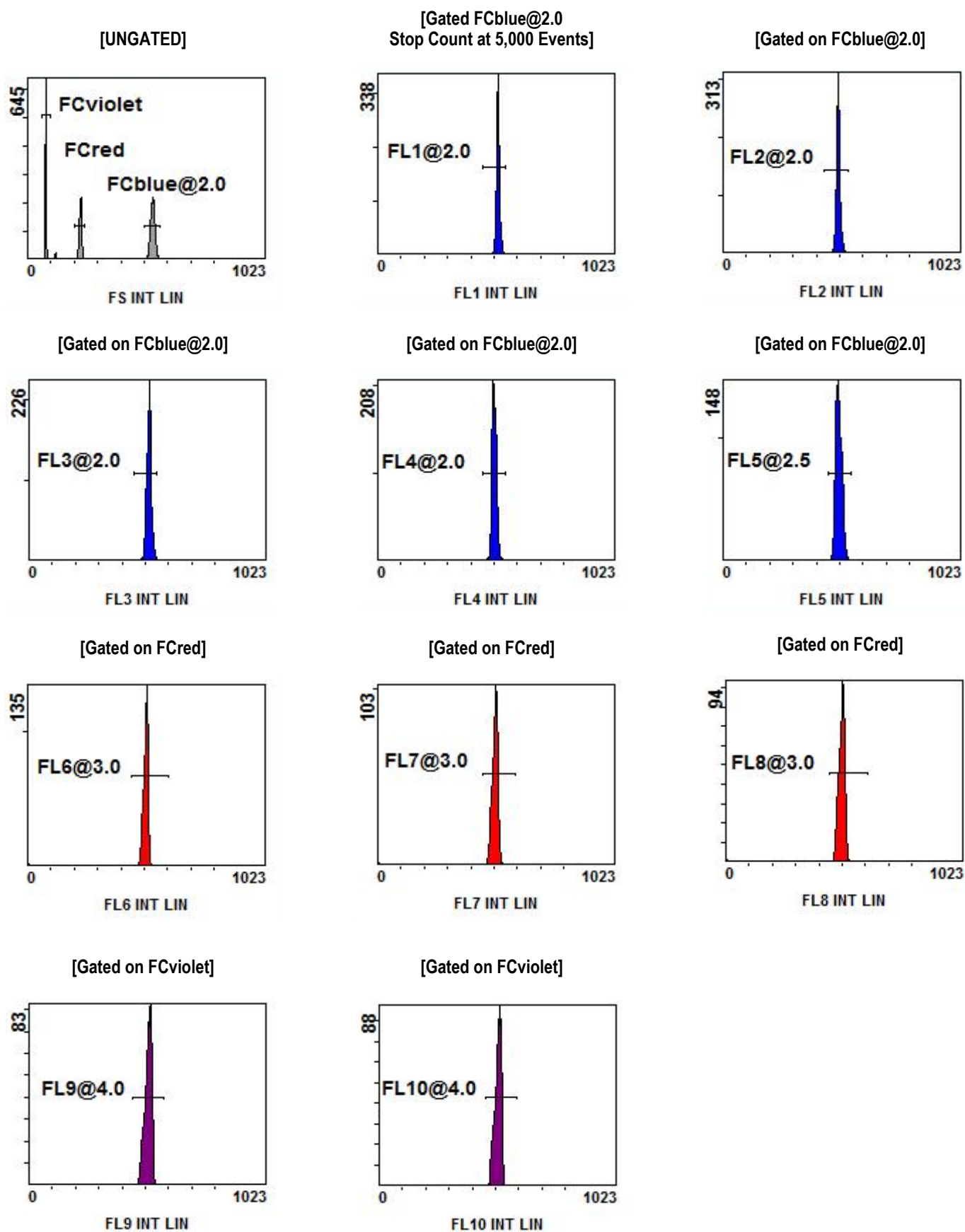
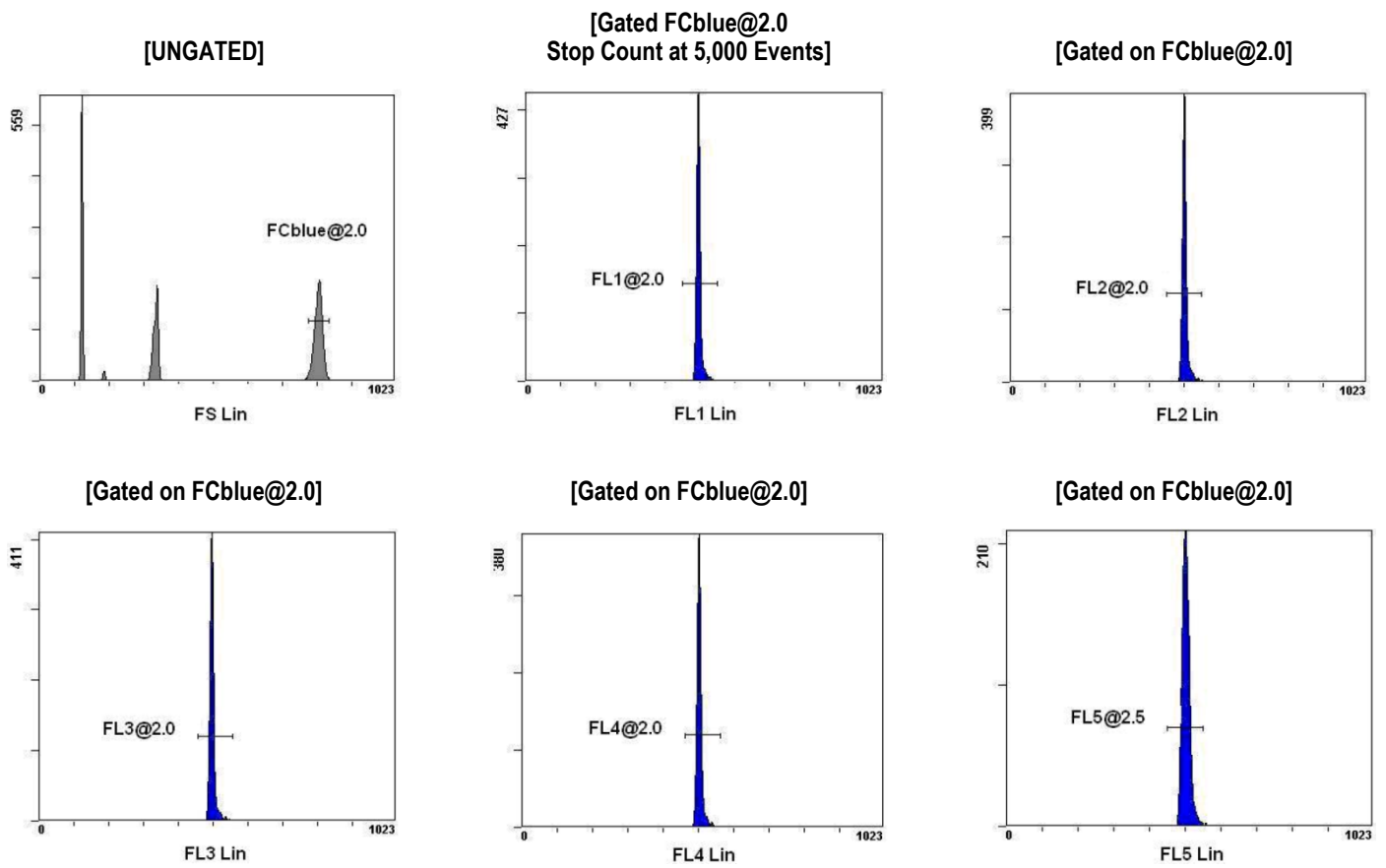


Figure 2. An example of the Flow-Check Pro Fluorospheres protocol for the Cytomics FC 500 with CXP Software with the Argon Laser 488 nm excitation.

NOTE: The 3 μm violet and 6 μm red excited beads viewed on the Forward Scatter plot are not required for Cytomics FC 500 one-laser HPCV evaluation.



Flow-Set Pro Fluorospheres

REF A63492

PN A70447-AN



Flow Cytometer Standardization Fluorospheres

For In Vitro Diagnostic Use

Rx Only in the U.S.A.

INTENDED USE

Flow-Set Pro Fluorospheres is a suspension of fluorescent microspheres used as an aid in standardizing forward scatter, side scatter, and fluorescence detectors on the Cytomics FC 500 (FL1-5), Navios and Navios EX Flow Cytometers (FL1-10).

SUMMARY AND EXPLANATION

In flow cytometric analysis, cell size is determined through the analysis of its light scatter characteristics, and cell immunophenotype is defined by specific antibodies tagged with fluorescent dyes. Thus, it is important that light scatter and fluorescence parameters on a flow cytometer are standardized to ensure optimal instrument performance on a daily basis. The use of fluorospheres to standardize light scatter intensity and fluorescence intensity focusing is widely accepted.¹⁻³

Instrument standardization should be performed with the same detector settings used to run test samples.¹ Each laboratory should determine optimum instrument settings for their own instruments and establish their own daily values.¹ Fluorospheres can be used to standardize the following two flow cytometer parameters: light scatter intensity and fluorescence intensity. These instrument parameters can be standardized by determining the values of Forward Scatter (FS), Side Scatter (SS) and fluorescence intensity when the fluorospheres are tested using laboratory and application-specific instrument settings. Instrument performance can be monitored daily by measuring the instrument settings needed to obtain the values for each of the desired parameters of the fluorospheres.

PRINCIPLES OF TEST

This reagent depends on the ability of a flow cytometer to detect particle size and to detect fluorescence signals at various wavelengths. Flow-Set Pro Fluorospheres is a suspension of fluorospheres with uniform and stable size and fluorescence intensity. The stability of these product parameters allows for the standardization of light scatter and fluorescence intensity instrument settings used for the quantitative analysis of human leukocytes.

REAGENTS



Flow-Set Pro Fluorospheres
REF A63492 - 3 x 10 mL vials

REAGENT CONTENTS

Flow-Set Pro Fluorospheres consist of 3 µm (nominal diameter) polystyrene fluorospheres suspended in an aqueous medium containing surfactants and preservatives

at 1 x 10⁶ fluorospheres/mL (nominal concentration). The fluorescence emission of the dyes contained within the fluorosphere ranges from 515-800 nm, 640-800 nm and 400-500 nm when excited by the 488 nm, 633-638 nm and 405 nm lasers respectively.

STATEMENT OF WARNINGS

	WARNING
reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) <0.05%	
May cause an allergic skin reaction.	
Harmful to aquatic life with long lasting effects.	
Avoid release to the environment.	
Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.	
If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.	
Take off contaminated clothing and wash it before use.	
	Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs .

1. This product should only be used in its suspension medium. Addition of organic solvents or high ionic strength solutions may irreversibly swell or aggregate fluorospheres.
2. Fluorospheres will settle over extended periods. Ensure that the fluorospheres are completely resuspended before use.
3. Do not expose fluorospheres to light during storage.
4. Do not use fluorospheres beyond the expiration date on the vial label.
5. Do not use fluorospheres dispensed into a test tube beyond 3 hours.
6. Use Good Laboratory Practices (GLP) when handling this reagent.

STORAGE CONDITIONS

This reagent is stable to the expiration date on the vial label when stored at 2-8°C. Do not freeze. Minimize exposure to light. Open vial stability is 65 days. Open vials must be refrigerated after use. Fluorospheres dispensed into test tubes must be discarded after 3 hours.

EVIDENCE OF DETERIORATION

The appearance of secondary fluorescent populations containing more than 20% of the total population may indicate deterioration and the product should not be used.

REAGENT PREPARATION

Flow-Set Pro Fluorospheres must be thoroughly mixed prior to use. Samples in test tubes should be vortexed before use. Do not use fluorospheres dispensed into a test tube beyond 3 hours. No other sample preparation is necessary.

PROCEDURE

MATERIAL SUPPLIED

Flow-Set Pro Fluorospheres
REF A63492 - 3 x 10 mL vials

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Appropriately sized test tubes
Flow cytometer
Vortex Mixer

Procedure for Establishing Target Channels and High Voltage (HV) and Gain Ranges

NOTE: Flow-Set Pro Fluorospheres can be used as an alternative product on the Cytomics FC 500 Flow Cytometer with CXP Software where the product labeling and software denotes Flow-Set, Flow-Set 675 and/or Flow-Set 770 Fluorospheres with the following exceptions:

Performance characteristics for use with the Cytomics FC 500 Flow Cytometer two laser co-linear excitation configurations have not been established.

These applications require the use of Flow-Set Fluorospheres, PN 6607007:

- tetraCXP
- stemCXP
- FlowCARE PLG CD4 Reagent, PN 627808
- LeukoSure Enumeration Kit, PN 175621
- LeukoSure Fluorospheres, PN 6607124

Use this procedure to establish Target Channels and HV and/or Gain ranges for fluorescence and/or light scatter parameters for standardization of the reagent application. **If using an automated Beckman Coulter flow cytometry IVD System**, target ranges do not need to be established as they are provided for each lot on the assay sheet included in this kit. High Voltage and Gain Ranges to monitor the instrument are established by running Flow-Set Pro Fluorospheres at various time intervals following instrument warm up and alignment over at least 5 days to achieve 20 data points. Refer to Steps 12 and 13 for high voltage and gain range specifications and **Special Notes for QC Data Review for Scatter Parameters: True (Total) Gain**.

If using a particular Beckman Coulter application, please refer to that application's system guide and follow the related instructions for Instrument Setup, including standardization and Daily QC monitoring.

1. Verify that the flow cytometer is optimally aligned.
 2. Use the filter set recommended by the manufacturer for detecting the fluorescence parameters to be analyzed (refer to the Instrument Instructions for Use or the reagent package insert).
 3.
 - a. **For fluorescence and/or light scatter ranges:**
Using the appropriate test protocol, run a stained sample that includes a negative fluorescent population(s), (for example, an isotypic control), and adjust Forward Scatter (FS) and Side Scatter (SS) high voltages and gains to optimize the resolution of all cell clusters. Adjust the appropriate fluorescence (HV) to position the negative fluorescence at the end of the first decade. Record the instrument settings for FS, SS, and fluorescence parameters.
 - b. **For CD45 gating:**
Using the appropriate test protocol, run a sample stained with a monoclonal antibody reagent containing CD45. Adjust Side Scatter (SS) and CD45 fluorescence high voltages and gains to optimize the resolution of all leukocyte clusters. Record the instrument settings for SS and CD45 parameters.
 4. Create a fluorospheres protocol of histograms for each desired light scatter and log fluorescence parameter. Assign the FS histogram region as the gate for the SS and log fluorescence histograms. Create a linear region (cursor) within each histogram (see Figure 1).
 5. Input the instrument settings determined in step 3 above. Set color compensation to 0% for all fluorescence parameters. Set a stop on 10,000 events on a fluorescence parameter.
 6. Vigorously mix the Flow-Set Pro Fluorospheres vial. Dispense 15-20 drops (about 0.5 mL) of Flow-Set Pro Fluorospheres into a test tube.
- IMPORTANT:** TO AVOID CONTAMINATION AND DEGRADATION, DO NOT USE FLUOROSPHERES DISPENSED INTO A TEST TUBE BEYOND 3 HOURS.
7. Vortex and run the fluorospheres sample.

8. If necessary, adjust the FS region to encompass the main population of fluorospheres. If necessary, adjust the FS discriminator to a level sufficiently low to allow the display of the main FS population. Ensure that cursors are placed across the population peaks for all desired parameters.
9. Record the X-Mode (fluorescent intensities) for all desired parameters.
10. Repeat steps 3 through 9, omitting step 4, until 20 data points have been collected. Collect data at various time intervals following instrument warm up and alignment over at least 5 days (being sure to record the settings as described in step 9).
11. After the 20 data points have been collected and recorded, calculate the average of the X-Mode values for the desired parameters; these will be your target values. Refer to the applicable instrument Instructions for Use for instructions on how to enter these established target values into the Application Definition Wizard for standardization. Guidelines for setting region widths may be found in the applicable instrument Instructions for Use.
12. Calculate and record the Average $\pm 2SD$ or $\pm 1\%$ range (whichever is greater) for HV and/or Gain ranges for each parameter. Use the Average $\pm 2SD$ or $\pm 1\%$ range to create a Levey-Jennings chart for each desired parameter.
13. Ninety-five percent (95%) of values should fall within the $\pm 2SD$ or $\pm 1\%$ range (whichever is greater) of the HV and/or Gain ranges for each parameter.
14. Repeat steps 1 to 12 for each new application requiring different instrument settings, and any time significant changes are made to scatter or fluorescence signals (that is, photomultiplier tube replacement, laser alignment, and so forth).
15. After establishing Target Channel Ranges for fluorescence and light scatter parameters, and instrument HV and/or Gain ranges, perform the Procedure for Daily Instrument Standardization. For the Cytomics FC 500 Flow Cytometer, proceed to the next step for the required CXP protocol modifications, prior to performing the Procedure for Daily Instrument Standardization.
16. When running on a Cytomics FC 500 Flow Cytometer, perform the following steps:
 - a. Add Flow-Set Pro Fluorospheres as a QC Product (Report Generator Edit Products screen) following the instructions in the Online Help.
 - b. Edit and save the existing Flow-Set standardization protocols (*_STAND), or any standardization protocol created by the Application Definition Wizard, with regions, region names and gate assignments modified per Figure 2. Refer to the CXP Online Help for details on editing regions and gate assignments in a protocol.
 - c. Edit the *_STAND protocol regions that will be selected for QC export in the Regions Properties dialog. Refer to the CXP Online Help for instructions on how to set up QC Regions for export to the Report Generator Levey-Jennings plots. Save the protocol.

NOTE: CXP_STAND protocols are programmed to run at a low flow rate. Navios_STAND protocols are programmed to run at a medium flow rate.

Procedure for Daily Instrument Standardization

1. Verify that the flow cytometer is optimally aligned.
2. Use the filter set recommended for detecting the fluorescence parameters to be analyzed (refer to the Instrument Instructions for Use or the reagent package insert).
3. Schedule the appropriate AutoSetup Application (refer to the appropriate instrument IFU for instructions on scheduling AutoSetup Applications). If running a manual protocol, select the Flow-Set Pro Fluorospheres protocol for analysis (refer to step 4 in

Procedure for Establishing Target Channels and High Voltage and Gain Ranges).

4. Vigorously mix the Flow-Set Pro Fluorospheres vial.
5. Dispense 15-20 drops (about 0.5 mL) of Flow-Set Pro Fluorospheres into a test tube.

IMPORTANT: TO AVOID CONTAMINATION AND DEGRADATION, DO NOT USE FLUOROSPHERES DISPENSED INTO A TEST TUBE BEYOND 3 HOURS.

6. Vortex and run the fluorospheres sample.
7. If running the AutoSetup, follow the Instrument Instructions for Use to verify appropriate auto adjustments. If running a manual standardization protocol, adjust instrument settings to place each fluorospheres peak within the target range determined as your laboratory reference range (refer to Procedure for Establishing Target Channels and HV and/or Gain Ranges).
8. Verify the associated QC Template for the automatic update of the X-Mode values to the on-board Levey-Jennings Plots and Data Table. Alternatively, record the X-Mode (fluorescent intensities) and HV and/or Gain ranges for each parameter in a daily log.
9. Verify the associated QC Template for the automatic update of the HV and/or Gain values to the on-board Levey-Jennings Plots and Data Table. Alternatively, plot the HV and/or Gain values for each desired parameter on its respective Levey-Jennings graph.
10. Repeat steps 1 to 9 on a daily basis.
11. Ninety-five percent (95%) of values should fall within the $\pm 2SD$ or $\pm 1\%$ range (whichever is greater) of the HV and/or Gain ranges for each parameter. If values drift outside this range, refer to the TROUBLESHOOTING section.

Special Notes for QC Data Review for Scatter Parameters: True (Total) Gain

Amplification of the FS and SS signals is controlled through True (Total) Gain adjustments. Total Gain is the result of Vernier Gain ("Voltage") and linear amplification (Gain) combined.

- Autoseup optimizes linear parameter Voltage and Gain to ensure the lowest level of system noise. On occasion, the system may adjust the gain setting up at one data point, which will result in a lower corresponding decrease in voltage at a given target channel range. Alternatively, it could adjust the gain down and the voltage up, for the same target range at a different data point.
- Understanding the co-dependency between Voltage and Gain for Total Gain is important in the evaluation of linear parameter QC data. Both Voltage and Gain QC data should be evaluated together. The linear parameter Total Gain can be calculated manually using the following formula:

$$\text{True (Total) Gain} = \text{Gain} \times [1 + (0.003 \times \text{HV})]$$

- Total Gain can be plotted on a Levey-Jennings chart in place of voltage.

Procedure for Lot to Lot Verification

NOTE: Use this procedure when changing lots of Flow-Set Pro Fluorospheres. Run the new and old lots in parallel, according to the laboratory's established procedures, to determine the average target channels and HV and/or Gain ranges for the new lot. If using an automated Beckman Coulter flow cytometry IVD System, Lot to Lot Verification does not need to be performed. Refer to the Table of Application Target Settings for applicable target values for the specific lot.

1. Verify that the flow cytometer is optimally aligned.
2. Use the filter set recommended for detecting the fluorescence and scatter parameters to be analyzed

(refer to the Instrument Instructions for Use or the reagent package insert).

3. Select the standardization protocol currently in use in the laboratory. Using the current lot of Flow-Set Pro Fluorospheres, perform the daily standardization procedure. Record the X-Mode (fluorescent intensities) and HV and/or Gain for each parameter in the laboratory's current daily log.
4. Vigorously mix a vial of the new lot of Flow-Set Pro Fluorospheres.
5. Dispense 15-20 drops (about 0.5 mL) of the new lot of Flow-Set Pro Fluorospheres into a test tube.

IMPORTANT: TO AVOID CONTAMINATION AND DEGRADATION, DO NOT USE FLUOROSPHERES DISPENSED INTO A TEST TUBE BEYOND 3 HOURS.

6. Vortex and run the fluorospheres sample.
7. Run the new lot of Flow-Set Pro Fluorospheres using the same settings as in step 3 above. Ensure that the regions are placed around the populations peaks for all desired parameters.

NOTE: If using an *_STAND protocol, be sure to check "AutoAdjust disable" on the AutoSetup II Wizard when running the new lot of Flow-Set Pro Fluorospheres.

8. Record the X-Mode (fluorescent intensities) for all desired parameters.
9. After the appropriate number of repetitions have been completed and recorded, calculate and record the average X-Mode and determine target ranges for each parameter according to the Instrument Instructions for Use.
10. Transfer the new target channels to the Flow-Set Pro Fluorospheres protocol. If necessary, adjust the region positions to reflect the new target channels. Refer to the applicable instrument Instructions for Use for instructions on how to modify region lower and upper limit values in the Flow-Set Pro Fluorospheres protocol. Guidelines for setting region widths may be found in the applicable instrument Instructions for Use.
11. Use the new target ranges when performing the Procedure for Daily Instrument Standardization.

LIMITATIONS

1. Instrument settings vary according to the sample preparation method used and should be set accordingly. Each laboratory should determine its own reference ranges for each instrument, each sample preparation and each fluorescent dye used.
2. Performance characteristics for use with the Cytomics FC 500 Flow Cytometer two laser co-linear excitation configurations have not been established.

TROUBLESHOOTING


1. Ensure that the sample has not been diluted or contaminated.
2. Ensure that Flow-Set Pro Fluorospheres has been adequately mixed.
3. Check for excessive bubbles in the sheath filter. If a clog or bubble is suspected, flush or prime the sample line.
4. Refer to the Instrument Instructions for Use for additional troubleshooting steps.
5. Verify that the FS discriminator has been appropriately set to display the entire main population of 3 μm fluorospheres.
6. If more than 5% of the values are outside the range, and gain adjustments have occurred, your laboratory reference ranges may need to be established. Refer to Procedure for Establishing Target Channels and High Voltage and Gain Ranges.



REFERENCES

1. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline-Second Edition. 2007. CLSI document H42-A2.
2. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: A report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. 1993. Cytometry, 14:702-715.
3. Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4+ T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. January 31, 2003. MMWR 2003; 52 (No. RR-2):1-15.

PRODUCT AVAILABILITY

Flow-Set Pro Fluorospheres
 A63492 - 3 x 10 mL vials

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

May be covered by one or more pat. - see www.beckman.com/patents

For additional information, or if damaged product is received, call Beckman Coulter Customer Service at 800-742-2345 (USA or Canada) or contact your local Beckman Coulter Representative.

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (PN C05838).

 Beckman Coulter Ireland Inc.
Lismeehan
O'Callaghan's Mills
Co. Clare, Ireland
www.beckman.com

© 2020 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision History

Revision AL, 09/2017

Changes were made to:
■ Add new languages

Revision AM, 07/2018

Changes were made to:
■ Procedure for Establishing Target Channels and High Voltage (HV) and Gain Ranges
■ Add new languages

Revision AN, 01/2020

Changes were made to:
■ STATEMENT OF WARNINGS



Figure 1: Example of an instrument protocol using Flow-Set Pro Fluorospheres to standardize a flow cytometer for ten-color analysis.

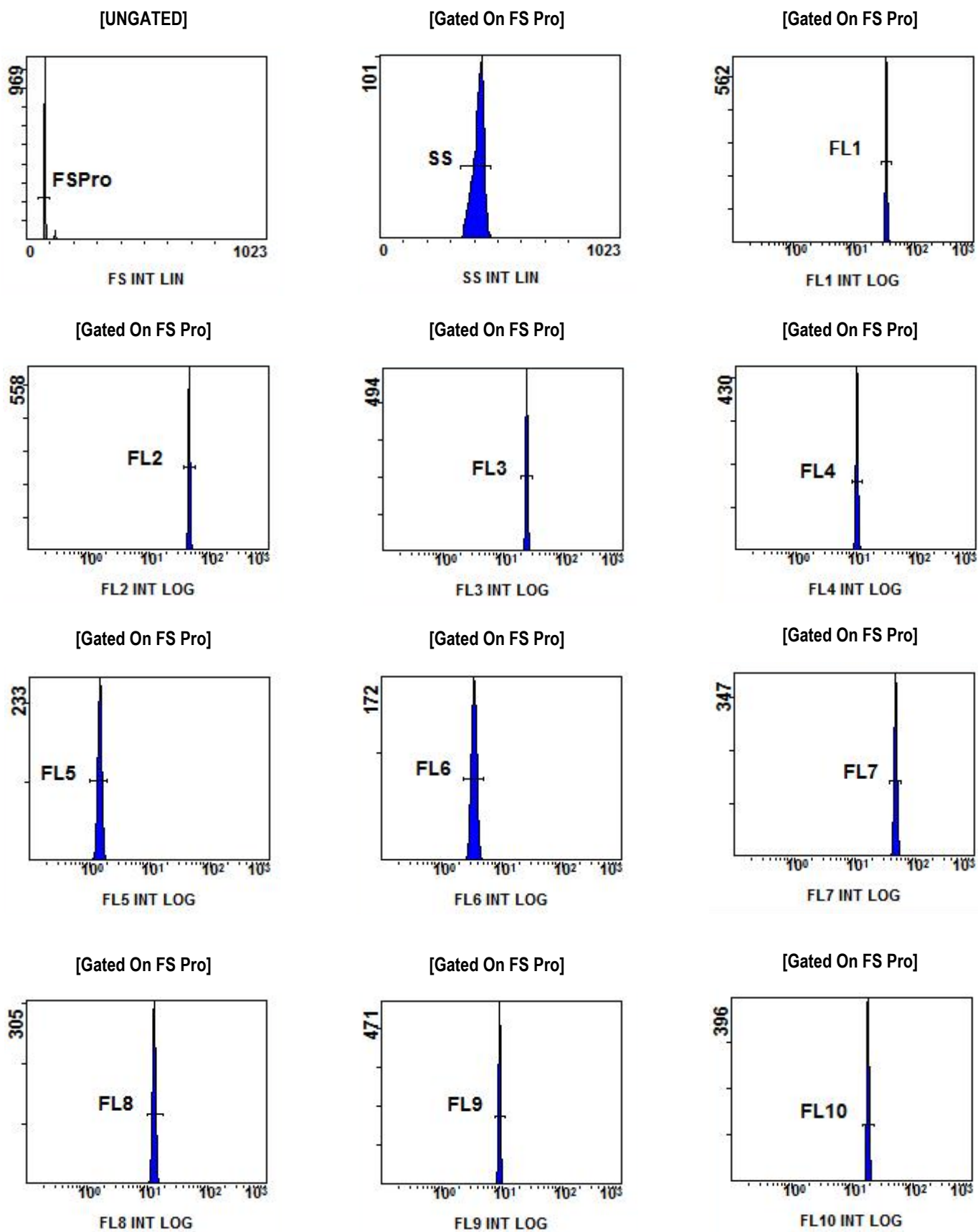
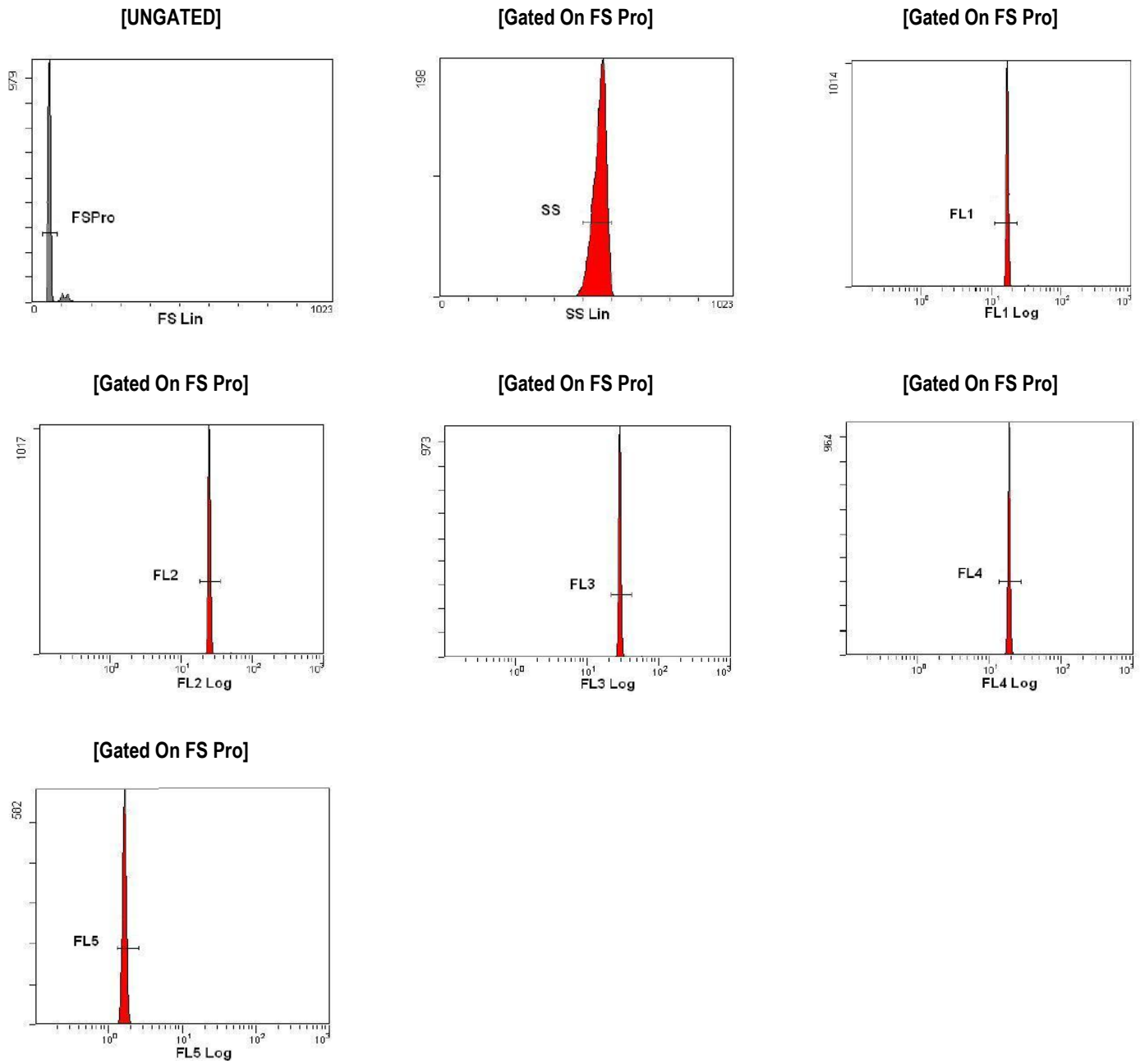


Figure 2: Example of a Flow-Set Pro Fluorospheres protocol for the Cytomics FC 500 with CXP software for the five-color, one laser application.



	Specificații
Specificitate	HLA-DR
Clonă	Immu-357
Hibridom	X63 x balb/c
Imunogen	EBV-transformed cell line
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Raport molar	FITC/Ig: 5,0 - 7,0
Excitare λ	488 nm
Vârful de emisie	525 nm
Tampon	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA și 0,1% NaN ₃

Anticorpi conjugați >IOTest

Anti-HLA-DR-FITC

REF B96758 100 de teste; 2 ml, 20 μl/test

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acești anticorpi conjugați cu fluorocrom permit identificarea populațiilor celulare care exprimă antigenul HLA-DR prezent în sângele periferic uman cu ajutorul citometriei în flux.

PRINCIPIU

Acest test se bazează pe abilitatea anticorpilor monoclonali specifici de a se lega de determinanții antigenici exprimați de leucocite.

Colorarea specifică a leucocitelor este efectuată prin incubarea probei cu reactivul IOtest. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Citometrul de flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca suporturi în faza de stabilire a porțiilor (gating) în funcție de utilizarea aleasă.

EXEMPLE DE UTILIZĂRI CLINICE

Molecula HLA-DR este un marker util pentru identificarea anumitor sindroame limfoproliferative atunci când este utilizată într-o secvență de imunofenotipare extinsă. Analiza exprimării antigenului HLA-DR permite caracterizarea celulelor blastice de origine mieloidă. Fenotipul lor observat frecvent este HLA-DR+ CD7– CD45weak. Leucemiile de tipul promielocitar hipergranular (subgrupul LAM-M3) sunt însă caracterizate prin prezența slabă sau prin absența completă a markerului HLA-DR (1).

REACTIVI

Concentrație: a se vedea certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckmancoulter.com.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. A nu se congela.
3. Înainte de utilizare, lăsați reactivul să ajungă la temperatura camerei (18–25°C).
4. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
5. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
6. Soluțiile de anticorpi care conțin azidă de sodiu (NaN₃) trebuie manipulate cu atenție. Nu ingerați și evitați contactul cu pielea, mucoasele și ochii.
În plus, într-un mediu acid, azida de sodiu poate forma acid hidrazoic, un compus potențial periculos. Dacă este necesară eliminarea reactivului, se recomandă ca acesta să fie diluat într-un volum mare de apă înainte de a fi vărsat în sistemul de canalizare, pentru a evita acumularea azidei de sodiu în conductele metalice și pentru a preveni riscul de explozie.
7. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
8. Nu pipetați niciodată cu gura și evitați contactul probelor cu pielea, mucoasele și ochii.
9. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.
10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Nu este clasificat ca periculos

SDS	Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs
------------	---

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Înainte și după desigilarea fiolei, formele lichide de conjugat trebuie păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C într-un loc ferit de lumină.

Stabilitatea flaconului sigilat: a se vedea data expirării de pe flacon.

Stabilitatea flaconului desigilat: reactivul este stabil timp de 180 (de) zile.

PROBE

Sângele venos trebuie recoltat utilizând eprubete sterile care conțin o sare de EDTA drept anticoagulant.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probelor prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CUPRINS

Conservantul din azida de sodiu poate crea compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Buletinul NIOSH: Azidă cu risc de explozie) (08/16/1976).

Pentru a evita posibila acumulare de compuși de azidă, spălați cu apă conductele pentru evacuarea deșeurilor după eliminarea reactivului nediluat. Eliminarea azidei de sodiu trebuie realizată în conformitate cu reglementările locale aplicabile.

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 20, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: Flow-Set Pro Fluorospheres (REF A63492) Flow-Check Pro Fluorospheres (REF A63493)
- Reactiv de liză a eritrocitelor cu faza de spălare după liză. De exemplu: VersaLyse (REF A09777).
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Ser de control izotipic: FITCreactiv IOTest (REF A07795)
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

Procedura cu reactiv VersaLyse

Pentru fiecare probă analizată, în plus față de eprubetă, se recomandă utilizarea unei eprubete pentru ser de control, în care celulele sunt amestecate în serul de control izotipic (REF A07795)

1. În fiecare eprubetă, adăugați 20 μl de anticorpi conjugați IOTest specifici și 20 μl de ser de control izotipic în fiecare eprubetă de ser de control.
2. Adăugați 100 μl de probă de test în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
3. Incubați timp de 15–20 de minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
4. Apoi, efectuați liza eritrocitelor, urmând recomandările pentru reactivul de liză utilizat.

De exemplu, dacă doriți să utilizați VersaLyse (REF A09777), consultați prospectul și urmați, de preferat, procedura denumită „cu fixare concomitentă”, care constă în adăugarea a 1 ml de amestec „Fixare și liză” preparat extemporaneu. Amestecați imediat în agitatorul vortex timp de o secundă și incubați timp de 10 minute la temperatura camerei, într-un loc ferit de lumină.

5. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Resuspendați peleta de celule utilizând 3 ml de PBS.
8. Repetați pasul 5.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule utilizând:

0,5 ml de PBS plus 0,1% de formaldehidă, dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 (de) ore. (PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținut prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

0,5 ml de PBS fără formaldehidă, dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.

Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C, în locuri ferite de lumină.

PERFORMANȚA

Datele privind performanța sunt obținute utilizând procedura descrisă mai sus, aplicată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă pe probe recoltate anterior în eprubete sterile cu sare de EDTA drept anticoagulant și păstrate la 18–25°C. Analiza este efectuată în decurs de 24 de ore după imunocolorare.

SPECIFICITATE

Anticorpus monoclonal Imm357 recunoaște un epitop situat pe o proteină monomorfă cu masa moleculară de 29–33 kDa identificată ca HLA-DR. Sistemul HLA (Antigen leucocitar uman) este numele dat complexului major de histocompatibilitate (MHC) la om. Codificate de 5 loci (DM, DO, DP, DQ și DR) ai locusului D, moleculele HLA din clasa II mai sunt numite și antigene HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ și HLA-DR (2,3). Exprimarea antigenelor din clasa II este limitată la celulele prezentând antigene, adică limfocite B, monocite/macrofage, celule dendritice și celule Langerhans epidermice (3,4). Pe limfocitele T, antigenul HLA-DR este exprimat numai după activare (5). Celulele stem și progenitoarele hematopoietice îl exprimă până într-un anumit stadiu al diferențierii lor (3,6).

LIMITA DE DETECȚIE

LIMITA DE DETECȚIE CU VERSALYSE

A fost realizat un studiu în conformitate cu documentul CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-second Edition (Evaluarea capacității de detecție în cazul procedurilor de măsurare din laborator; a doua ediție a ghidului aprobat) (7). Limita de detecție (LOD) este cea mai redusă concentrație de analit care poate fi detectată în mod constant. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Limita de detecție
Lymphocytes HLA-DR-FITC+	1 cell/ μ L
Monocytes HLA-DR-FITC+	2 cells/ μ L

PRECIZIE

PRECIZIA CU VERSALYSE

Procentajul de colorare al unei ținte pozitive a fost determinat cu ajutorul a două probe de sânge testate în zece replici, în aceeași zi și utilizând același citometru.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Ținta pozitivă	Număr	Medie (%)		Deviație standard		valoare limită (%)	
		Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2	Donor 1	Donor 2
Lymphocytes HLA-DR-FITC+	10	18,43	30,03	0,88	0,61	4,78	2,04
Monocytes HLA-DR-FITC+	10	98,91	99,77	0,83	0,22	0,84	0,22

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Este de preferat să se utilizeze o tehnică de liză a eritrocitelor (RBC) cu o etapă de spălare, deoarece acest reactiv nu a fost optimizat pentru tehnici de liză „fără spălare”.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Anticorpii conjugați din acest reactiv sunt calibrați astfel încât să ofere cel mai bun raport semnal specific / semnal nespecific. Prin urmare, este important ca la fiecare test să se respecte raportul volum de reactiv / volum de probă.
5. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (8).
6. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (9).

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)

	Specificații
	Soluție de lizare gata de utilizare VersaLyse
Formulă	Lichidă
Volum	100 ml
Număr de flacoane	1 flacon
Volum per test	1 ml (gata de utilizare atunci când este utilizat fără fixare concomitentă)

VersaLyse

Soluție de liză

REF

1 ml/test, A09777
100 teste; 100 ml

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Acest reactiv este destinat lizării eritrocitelor în prepararea probelor biologice pentru analiza citometrică în flux. Reactivul VersaLyse este compatibil cu toate tipurile de citometre și se utilizează cu sau fără spălare după incubare atât timp cât în protocol sunt utilizați anticorpi fluorescenți calibrați corespunzător. De asemenea, reactivul VersaLyse permite tratarea probelor chiar și după ce au fost spălate în prealabil, de exemplu pentru eliminarea imunoglobulinelor serice (1,2,3,4,5).

PRINCIPIU

Proba conținând eritrocite de lizat se expun la reactivul VersaLyse timp de cel puțin 10 minute. Principalul ingredient activ al reactivului VersaLyse este o amină ciclică, care, în contact cu anhidraza carbonică prezentă în eritrocite, se transformă într/un compus foarte litic pentru aceste celule.

Acest reactiv se utilizează cu anticorpi conjugați specifici care sunt capabili să se lege la leucocite din cauza determinantilor antigenici pe care-i exprimă. Colorarea specifică a leucocitelor se realizează prin incubarea probei cu anticorpii sau anticorpii. Eritrocitele sunt ulterior îndepărtate prin liză, iar leucocitele, care nu sunt afectate de acest proces, sunt analizate prin citometrie în flux.

Preparatele trebuie păstrate la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C și analizate apoi imediat utilizându-se citometrie în flux. În cazul unei întârzieri de câteva ore înainte de efectuarea analizei, preparatele pot fi fixate cu PBS conținând 0,1% formaldehidă (consultați prospectul tehnic al soluție de fixare IOTest 3 – REF A07800 – pentru prepararea acestui PBS cu 0,1% formaldehidă). În acest caz este necesară spălare prealabilă.

Citometrul în flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă delimitarea populațiilor de interes în fereastra electronică definită pe o histogramă, care corelează difuzia ortogonală a luminii (Dispersia perpendiculară sau SS – Side Scatter) și difuzia luminii sub un unghi ascuțit (Dispersia pe direcția înainte sau FS – Forward Scatter). Alte histograme care combină doi dintre parametrii diferiți disponibili pe citometru pot fi utilizate ca ajutor în faza de stabilire a porților (gating) în funcție de aplicația aleasă de către utilizator.

Fluorescența celulelor delimitate se analizează pentru distingerea evenimentelor colorate pozitiv de cele necolorate. Rezultatele sunt exprimate ca procentaj de evenimente pozitive în raport cu toate evenimentele obținute de gating.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. A nu se utiliza reactivul după data expirării.
2. Nu depozitați în frigider; nu congelați.
3. Minimizați expunerea la lumină în timpul incubăției cu anticorpi fluorescenți.
4. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
5. Formaldehida este toxică și alergenă. De asemenea, este considerată fi cancerigenă. Nu pipetați niciodată folosind gura și evitați orice contact cu pielea, mucoasele, ochii și îmbrăcămintea.
6. Toate probele de sânge trebuie considerate potențial infecțioase și trebuie manipulate cu grijă (în special: purtarea de mănuși de protecție, halate și ochelari de protecție).
7. Eprubetele și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Soluție de liză VersaLyse

ATENȚIE



H315

Provoacă iritații cutanate.

H319

Provoacă iritația gravă a ochilor.

P280

Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.

P302+P352

ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA:

Spălați cu mult săpun și cu apă din abundență.

P305+P351+P338

ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.

P332+P313

În caz de iritare a pielii: solicitați sfat medical/îngrijire medicală.

P337+P313

Dacă iritația ochilor persistă: solicitați sfat medical/îngrijire medicală.

P362+P364

Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare.
Acid clorhidric 0,5 - 1,0%
Pyrrolidine 1 - 2%

SDS

Fișa tehnică de securitate este disponibilă la beckman.com/techdocs

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Reactivul VersaLyse trebuie păstrat la o temperatură cuprinsă între 18°C și 25°C. Dacă un flacon de VersaLyse a fost ținut accidental în frigider, trebuie adus la temperatura camerei (18°C–25°C) și se așteaptă cel puțin o oră înainte de utilizare.

Dacă flaconul este închis, reactivul este stabil până la data expirării arătată pe flacon.

După deschidere, reactivul este stabil timp de 90 de zile.

PROBE

Probele de sânge venos sau măduvă osoasă trebuie prelevate în eprubete sterile conținând o sare EDTA ca anticoagulant.

NB: citiți cu atenție în secțiunea ANTICOAGULANT condițiile în care pot fi utilizați alte anticoagulante.

Se recomandă păstrarea probelor la temperatura camerei (18–25°C). Acestea nu se vor scutura. Se recomandă omogenizarea probei prin agitare ușoară înainte de recoltarea probei de test.

Proba trebuie analizată în decurs de 24 de ore de la puncția venoasă.

PROBE SPĂLATE

Dacă doriți să spălați probele înainte de colorare urmată de lizarea eritrocitelor, este esențial să îndepărtați întregul supernatant după ultima centrifugare. Excesul de tampon de spălare pe peleta de celule poate reduce eficacitatea reactivului VersaLyse.

PREGĂTIREA PROBELOR

Concentrația de leucocite din probă trebuie să fie mai mică de 10⁴ celule/μl (10¹⁰ celule/l). Dacă este necesar, diluați în PBS pentru a aduce concentrația de leucocite la 5 x 10³ celule/μl (5 x 10⁹ celule/l).

Concentrația de eritrocite din probă trebuie să fie mai mică de 6 x 10⁶/μl (6 x 10¹² celule/l); se recomandă diluarea probei în PBS pentru a aduce concentrația de eritrocite la 5 x 10⁶ celule/μl.

În cazul în care concentrațiile de leucocite și de eritrocite necesită ajustare, trebuie utilizată diluția cea mai mare. Procedurile utilizează 100 μl de probă neprediluată sau prediluată per eprubetă.

DOVADĂ DE DETERIORARE

Orice modificare a aspectului fizic al reactivilor poate indica degradarea. În acest caz, nu se recomandă utilizarea reactivului.

În cazul în care ambalajul este deteriorat sau datele obținute indică unele modificări ale performanței, contactați distribuitorul local sau utilizați următoarea adresă de e-mail:

immuno-techsup@beckmancoulter.com

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârfuri de unică folosință pentru 10, 20, 100 și 1000 μ l.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.
- Granule de calibrare: fluorosfere Flow-Set (REF 6607007).
- Anticorpi fluorescenți specifici.
- Seruri de control izotipice.
- Soluție tampon (PBS: 0,01 M fosfat de sodiu; 0,145 M clorură de sodiu; pH 7,2).
- Reactiv de fixare: de exemplu soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800).
- Centrifugă.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURA CU REACTIVUL VERSALYSE

Observație: procedurile de mai jos sunt valabile pentru aplicații standard. Volumele de probe și/sau VersaLyse pentru anumite aplicații Beckman Coulter pot fi diferite. Într-un astfel de caz, urmați instrucțiunile din prospectul tehnic al aplicației.

A – Procedura fără fixare concomitentă

Pregătirea reactivului

Nu este necesară preparare. Utilizați reactivul VersaLyse direct din flacon.

Pentru fiecare probă analizată, în afară de eprubeta de testare, este necesară o eprubetă de control în care la celule se adaugă controlul izotipic corespunzător colorării specifice selectate.

1. Adăugați în fiecare eprubetă cantitatea de anticorpi recomandată de către producător pentru colorarea a 5×10^5 leucocite.
2. Adăugați în fiecare eprubetă de control cantitatea de ser de control izotipic recomandată de către producător pentru colorarea a 5×10^5 leucocite.
3. Adăugați 100 μ l de probă (prediluată sau altfel) în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
4. Incubați respectând condițiile specificate în prospectul tehnic pentru anticorpii utilizați.
5. Adăugați 1 ml de VersaLyse și agitați imediat cu vortex timp de 1 secundă.
6. Incubați timp de 10 minute la temperatura camerei (18°C–25°C) într-un loc ferit de lumină.

În cazul unei proceduri fără spălare, eprubetele sunt pregătite pentru analiza citometrică.

NB: dacă preparatele trebuie spălate, nu analizați înainte de a efectua pașii 7–11.

7. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.

IMPORTANT: s-a observat că, atunci când se utilizează procedura cu fixare concomitentă și un pas de spălare, se pot forma dublete celulare, denumite și evadate, existând posibilitatea generării unor rezultate eronate din cauza modificării proprietăților lor de dispersie a luminii și a faptului că evadează din regiunile de gating⁽⁶⁾. O amestecare energetică cu agitatorul vortex poate perturba aceste dublete.

8. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
9. Resuspendați peleta de celule în 3 ml de PBS.
10. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
11. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule în:

- 0,5 ml sau 1 ml de PBS plus 0,1% formaldehidă dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 de ore. (O soluție PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținută prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).
 - . 0,5 ml sau 1 ml de PBS fără formaldehidă dacă preparatele trebuie analizate în decurs de 2 ore.
- Observație: în toate cazurile, păstrați preparatele la temperaturi cuprinse între 2°C și 8°C și în locuri ferite de lumină.

B – Procedura cu fixare concomitentă

Pregătirea reactivului

Pregătiți imediat amestecul „fixare și lizare” adăugând 25 μl de soluție de fixare NEDILUATĂ IOTest 3 10X* (REF A07800) la 1 ml de VersaLyse.

Amestecați eprubetele în agitatorul vortex timp de 3–5 secunde.

(*) NB: în contextul amestecului „fixare și lizare”, soluția de fixare IOTest 3 (REF A07800) este utilizată ca soluție concentrată 40X, nu ca soluție 10X (concentrație nominală).

Preparați un volum suficient de amestec „fixare și lizare” în funcție de numărul de probe de lizat (1 ml de amestec per eprubetă).

Pentru fiecare probă analizată este necesară, pe lângă eprubeta de testare, o eprubetă de control în care celulele sunt amestecate cu serul de control izotipic corespunzător colorării specifice selectate.

1. Adăugați în fiecare eprubetă cantitatea de anticorpi recomandată de către producător pentru colorarea a 5×10^5 leucocite.
2. Adăugați în fiecare eprubetă de control cantitatea de ser de control izotipic recomandată de către producător pentru colorarea a 5×10^5 leucocite.
3. Adăugați 100 μl de probă (prediluată sau altfel) în ambele eprubete. Amestecați cu grijă eprubetele în agitatorul vortex.
4. Incubați respectând condițiile specificate în prospectul tehnic pentru anticorpii utilizați.
5. Adăugați 1 ml de soluție „fixare și lizare” și amestecați imediat în agitatorul vortex timp de 1 secundă.
6. Incubați timp de 10 minute la temperatura camerei (18°C–25°C) într-un loc ferit de lumină.
În cazul unei proceduri fără spălare, eprubetele sunt pregătite pentru analiza citometrică.
NB: dacă preparatele trebuie spălate, nu analizați înainte de a efectua pașii 7–11.
7. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
8. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
9. Resuspendați peleta de celule în 3 ml de PBS.
10. Centrifugați timp de 5 minute la 150 x g la temperatura camerei.
11. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și resuspendați peleta de celule în 0,5 ml sau 1 ml de PBS plus 0,1% of formaldehidă dacă preparatele trebuie păstrate mai puțin de 24 de ore. (O soluție PBS cu 0,1% formaldehidă poate fi obținută prin diluarea unei cantități de 12,5 μl de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația de 10X în 1 ml de PBS).

Aceste preparate pot fi păstrate timp de 24 de ore la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C și neexpușe la lumină.

ANTICOAGULANT

Sarea tripotasică de EDTA (K3EDTA) dă cele mai bune rezultate indiferent de metoda utilizată: cu sau fără spălare după liză.

ACD și heparina dau rezultate bune cu toate procedurile, cu excepția procedurii fără fixare concomitentă urmată de spălare. Cu aceste coagulante, recomandăm procedura cu fixare concomitentă urmată de spălare.

ANALIZĂ

Reziduurile eritrocitare pot genera un semnal de difracție a luminii dispersate pe direcția înainte (FS) mai mare decât cel obținut cu alți reactivi de liză comerciali. În consecință, ajustarea obișnuită (sau, implicit, cea fixă) a discriminatorului („pragului”) pentru acest parametru poate fi prea mică pentru reactivul VersaLyse.

Prin urmare, este recomandabil să reglați citometrul în primele momente ale achiziției unui preparat tipic. În cazul unei probe de sânge integral, de exemplu, este recomandabil ca mai întâi să creșteți progresiv valoarea discriminatorului până când populațiile de leucocite sunt vizibile pe histograma FS vs. SS, iar apoi să ajustați cu atenție amplificarea semnalelor FS și SS pentru a obține o distribuție a populațiilor de leucocite identică celei din figurile 1 și 2.

PERFORMANȚA

puritate și recuperare a limfocitelor

Puritatea și recuperarea limfocitelor au fost evaluate în conformitate cu recomandările CDC (1). Sângele de la 10 donatori sănătoși eșantionat în K3EDTA a fost etichetat cu un amestec de anticorpi monoclonali CD45-FITC și CD14-PE. Valorile medii ale recuperării și purității, precum și domeniul pentru diferite proceduri sunt specificate în tabelele următoare:

Fără spălare		Cu fixare concomitentă	
Fără fixare concomitentă		Cu fixare concomitentă	
Recuperare	Puritate	Recuperare	Puritate
96,4	92,3	96,6	91,6
95/97,5	90,1/94,3	95,4/98,1	90,1/92,6

Cu spălare		Cu fixare concomitentă	
Fără fixare concomitentă		Cu fixare concomitentă	
Recuperare	Puritate	Recuperare	Puritate
95,6	94,0	96,2	97,2
95/97,3	90,3/97,3	95,4/97,5	92,7/99,4

REPRODUCTIBILITATE INTRALABORATOR

În aceeași zi și pe același citometru, pe aceeași probă (sânge integral de la un donator sănătos) au fost efectuate 31 de măsurători ale procentajului de CD3 + limfocite. Procedura de lizare utilizată a fost cea cu fixare concomitentă fără spălare. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Sânge integral	Număr	Medie (%)	Deviație standard	valoare limită (%)
CD3+ limfocite	31	60,72	1,61	2,7

LIMITĂRI

1. Citometria în flux poate furniza rezultate false dacă citometrul nu a fost aliniat perfect, dacă scurgerile de fluorescență nu au fost compensate corect și dacă regiunile nu au fost poziționate corect.
2. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
3. În cazul unei hiperleucocitoze, diluați sângele în PBS astfel încât să obțineți o valoare de aproximativ 5×10^9 leucocite/L (7).
4. În cazul unei poliglobulinemii, diluați proba în PBS pentru a obține 5×10^{12} eritrocite/L (8, 9, 10).
5. Reactivul VersaLyse trebuie adus la temperatura camerei (18°C–25°C) înainte de utilizare.
6. Verificați preparatele cu ochiul liber pentru a evalua eficacitatea lizei. Dacă preparatele sunt tulburi sau histogramele de difracție a luminii sunt neobișnuite, este posibil ca liza să fie incompletă.
7. Este posibil ca eritroblaștii să fie lizați incomplet și să apară într-o histogramă de difracție a luminii în aceeași locație ca și leucocitele (11).
8. Acetazolamida, un inhibitor al anhidrazei carbonice, poate inhiba complet acțiunea reactivului VersaLyse (12).
9. În anumite stări patologice, cum ar fi insuficiența renală severă sau hemoglobinopatiile, liza eritrocitelor poate fi lentă, incompletă sau chiar imposibilă. În acest caz, se recomandă izolarea celulelor mononucleare cu ajutorul unui gradient de densitate (de exemplu, Ficoll), înainte de colorare (13).

MĂRCI COMERCIALE

Beckman Coulter, logoul stilizat și mărcile de produse și servicii Beckman Coulter menționate aici sunt mărci comerciale sau mărci comerciale înregistrate ale Beckman Coulter, Inc. în Statele Unite și în alte țări.

Cheie simboluri

Glosarul de simboluri este disponibil la beckman.com/techdocs (număr document B60062)