



IOtest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 µL / test

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français (FR)	5
Deutsch (DE)	8
Italiano (IT)	11
Español (ES)	14
Português Portugal (PT-PT)	17
Svenska (SV)	20
Ελληνικά (EL)	23
Magyar (HU)	26
Čeština (CZ)	29
Slovenčina (SK)	32
Türkçe (TR)	35
Русский (RU)	38
Română (RO)	41
Србија (SR)	44
Português Brasil (PT-BR)	47
APPENDIX	50
REFERENCES	51

	Specifications
Specificity	CD71
Clone	YDJ1.2.2
Hybridoma	X63 x balb/c
Immunogen	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Immunoglobulin	IgG1
Species	Mouse
Purification	Affinity Chromatography
Fluorochrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Molar ratio	FITC / Ig: 5.0 - 8.5
λ excitation	488 nm
Emission Peak	525 nm
Buffer	PBS pH 7.2 plus 2 mg / mL BSA and 0.1% NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 μ L / test

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

This fluorochrome-conjugated antibody allows the identification and numeration of cell populations expressing the CD71 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 transferrin receptor (CD71) is expressed on proliferating cells including neoplastic cells, activated lymphocytes and hematopoietic precursor cells. CD71 expression has been used for immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes (1) as well as for discriminating fetal from maternal cells (2).

REAGENTS

Concentration: See lot specific Certificate of Analysis at www.beckmancoulter.com.

WARNING AND 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.
10. Reagents and waste should be eliminated according to local requirements.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

Not classified as hazardous

SDS	Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs
------------	--

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 180 days.

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.

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

CONTENTS

Sodium azide preservative may form explosive compounds in metal drain lines. See NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76).

To avoid the possible build-up of azide compounds, flush wastepipes with water after the disposal of undiluted reagent. Sodium azide disposal must be in accordance with appropriate local regulations.

MATERIALS NEEDED BUT NOT SUPPLIED WITH KIT:

- Sampling tubes and material necessary for sampling.
- Automatic pipettes with disposable tips for 20, 100 and 500 µL.
- Plastic haemolysis tubes.
- 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).
- Isotypic control FITC : IOTest reagent (Ref. A07795).
- Buffer (PBS: 0.01 M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PROCEDURE with VERSALYSE REAGENT

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. A07795.).

1. Add 20 µL of specific IOTest conjugated antibody to each test tube, and 20 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 less than 24hours. (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.

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 10 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 (%)
CD71-FITC+	10	10.87	2.96	27.26

Monocytes	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22.35	8.88	39.73

Granulocytes	Number	Mean (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1.81	1.16	64.02

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 CD71 molecule, known as the transferrin receptor or T9 antigen, is a homodimeric transmembrane glycoprotein of 190 kDa (3). CD71 is involved in iron uptake by binding transferrin (4). It is expressed by reticulocytes, erythroid precursors and capillary endothelial cells in brain (4, 5). All other known cell types express CD71 only when entering in proliferation (4).

The YDJ1.2.2 monoclonal antibody has been assigned to the CD71 at the 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens in Boston, USA, in 1993 (WS Code: A006, Section AA6) (3).

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 +CD71-FITC	12	48.15	1.11	2.31

Linearity

To test the linearity of staining of this reagent, a positive cell line (JURKAT) and a negative cell line (FRN3.4.14) 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)
CD71-FITC	$Y = 0.9915 X + 1.082$	0.9998

LIMITATIONS

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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).

See the Appendix for examples and references.

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.

Symbols Key

Glossary of Symbols is available at beckman.com/techdocs (document number B60062)

	Spécifications
Spécificité	CD71
Clone	YDJ1.2.2
Hybridome	X63 x balb/c
Immunogène	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Immunoglobuline	IgG1
Espèces	Souris
Purification	Chromatographie d'affinité
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Ratio Molaire	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ d'excitation	488 nm
Pic d'émission	525 nm
Tampon	PBS pH 7,2 additionné de 2 mg / mL BSA et de 0,1 % NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20µL/test

Réservé aux dosages diagnostiques *in vitro*

UTILISATION

Cet anticorps conjugué à un fluorochrome permet l'identification et la numération des populations cellulaires exprimant l'antigène CD71 présentes dans des échantillons biologiques humains par cytométrie en flux.

PRINCIPE

Ce test repose sur la capacité d'anticorps monoclonaux spécifiques de se fixer sur des cellules leucocytaires par les déterminants antigéniques qu'elles expriment.

Le marquage spécifique des leucocytes est réalisé en incubant l'échantillon avec le réactif IOTest. Les érythrocytes sont ensuite éliminés par lyse et les leucocytes, non affectés par cette étape, sont analysés par cytométrie en flux.

Le cytomètre de flux mesure la diffusion de la lumière ainsi que la fluorescence des cellules. Il permet la délimitation de la population d'intérêt à l'intérieur d'une fenêtre électronique, définie sur un histogramme qui corrèle la diffusion orthogonale de la lumière ("Side Scatter" ou SS) et la diffusion de la lumière aux angles étroits ("Forward Scatter" ou FS). D'autres histogrammes combinant deux des différents paramètres disponibles sur le cytomètre sont utilisables comme supports à l'étape de gating électronique en fonction de l'application choisie par l'utilisateur.

La fluorescence des cellules ainsi fenêtrées est analysée pour distinguer les événements positivement marqués des événements non marqués. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'événements positifs par rapport à l'ensemble des événements pris en compte par le fenêtrage électronique.

EXEMPLES D'APPLICATIONS CLINIQUES

Le récepteur de la transferrine (CD71) est exprimé par les cellules en prolifération y compris les cellules néoplasiques, les lymphocytes activés et les précurseurs hématopoïétiques. L'expression du CD71 a été utilisée pour la classification immunophénotypique des syndromes myélodysplasiques (1) ainsi que pour la discrimination entre les cellules fœtales et maternelles (2).

RÉACTIFS

Concentration : voir le certificat d'analyse spécifique du lot sur www.beckmancoulter.com.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption.
2. Ne pas congeler.
3. Laisser revenir à température ambiante (18 –25 °C) avant utilisation.
4. Minimiser les temps d'exposition à la lumière.
5. Eviter la contamination microbienne des réactifs ou des résultats erronés peuvent apparaître.
6. Les solutions d'anticorps contenant de l'azoture de sodium (NaN₃) sont à manipuler avec précaution. Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau, les muqueuses et les yeux.
Par ailleurs, en milieu acide, l'azoture de sodium peut former de l'acide hydrazoïque potentiellement dangereux. Lors de l'élimination, il est recommandé de diluer le réactif dans un grand volume d'eau avant de le verser dans le système d'évacuation des eaux pour éviter l'accumulation d'azoture de sodium dans les canalisations métalliques et prévenir le risque d'explosion.
7. Tout échantillon sanguin doit être considéré comme potentiellement infectieux et doit être manipulé avec les précautions d'usage (en particulier : port de gants, de blouse et de lunettes de protection).
8. Ne jamais pipeter à la bouche et éviter tout contact des échantillons avec la peau, les muqueuses et les yeux.
9. Les tubes de sang et le matériel à usage unique ayant servi à la manipulation doivent être éliminés dans des conteneurs ad hoc destinés à l'incinération.
10. Les réactifs et les déchets doivent être éliminés conformément aux exigences locales.

CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Non classifié comme dangereux

SDS	La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse techdocs.beckman.com
------------	---

CONSERVATION ET STABILITE

Les conjugués sous forme liquide doivent être conservés entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière, avant et après ouverture du flacon.

Stabilité flacon fermé : voir la date de péremption du réactif indiquée sur le flacon.

Stabilité du flacon ouvert : le réactif est stable pendant 180 jours.

ÉCHANTILLONS

Les prélèvements de sang veineux doivent s'effectuer sur tubes stériles contenant un sel d'EDTA comme anticoagulant.

Les échantillons se conservent à température ambiante (18 – 25 °C) et sans agitation. Avant d'effectuer la prise d'essai, il est recommandé d'homogénéiser le prélèvement par agitation douce.

Les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

PREUVE DE DÉTÉRIORATION

tout changement d'apparence physique du produit peut indiquer une détérioration et le produit ne doit pas être utilisé.

En cas de détérioration de l'emballage ou si les données obtenues indiquent certaines altérations des performances, veuillez contacter notre service Support Technique : 04 91 17 27 27 Fax : 04 91 17 27 25 immuno-techsup@beckmancoulter.com

CONTENU

L'azoture de sodium, utilisé comme agent de conservation, peut réagir avec le métal des canalisations et former des composés explosifs. Voir le NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazards (8/16/76) (Bulletin de l'Institut national pour la santé et la sécurité au travail: Les dangers d'explosion des azotures (16/08/1976)).

Pour éviter l'accumulation potentielle des composés d'azoture, rincer les tuyaux d'évacuation à l'eau après l'élimination de réactifs non dilués. L'élimination de l'azoture de sodium doit se faire conformément aux réglementations locales en vigueur.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI AVEC CE COFFRET:

- Tubes à prélèvement et matériel nécessaire aux prélèvements.
- Pipettes automatiques avec embouts jetables pour 20, 100 et 500 µL.
- Tubes à hémolyse en plastique.
- Réactif de lyse des érythrocytes avec étape de lavage après lyse. A titre d'exemple : VersaLyse (Réf. A09777).
- Réactif de fixation des leucocytes. A titre d'exemple : Solution de Fixation IOTest 3 (Réf. A07800).
- Contrôle isotypique FITC : réactif IOTest (Réf. A07795.).
- Tampon (PBS : 0,01 M phosphate de sodium; 0,145 M chlorure de sodium; pH 7,2).
- Centrifugeuse.
- Agitateur automatique (type Vortex).
- Cytomètre en flux.

PROCÉDURE avec RÉACTIF VERSALYSE

Nota Bene : La procédure ci-dessous est valable pour des applications standard. Les volumes d'échantillon et/ou de VersaLyse pour certaines applications Beckman Coulter peuvent être différents. Si tel est le cas, suivre les instructions de la fiche technique de l'application.

Pour chaque échantillon analysé, prévoir en plus du tube test, un tube contrôle dans lequel les cellules seront mises en présence du contrôle isotypique (Réf. A07795.).

1. Ajouter 20 µL d'anticorps conjugué spécifique IOTest à chaque tube test et 20 µL de contrôle isotypique dans chaque tube de contrôle.
2. Ajouter 100 µL de l'échantillon à tester dans les 2 tubes. Vortexer doucement.
3. Incuber 15 à 20 minutes à température ambiante (18 – 25 °C) et à l'abri de la lumière.
4. Procéder, si nécessaire, à la lyse des globules rouges en suivant les recommandations du réactif de lyse utilisé. A titre d'exemple, si l'on souhaite utiliser VersaLyse (Réf. A09777), se reporter à la notice et suivre de préférence la procédure dite « avec fixation concomitante » qui consiste à ajouter 1 mL du mélange "Fix-and-Lyse" préparé extemporanément. Vortexer immédiatement pendant une seconde et incuber 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Si l'échantillon ne contient pas de globules rouges, ajouter 2 mL de PBS.
5. Centrifuger à 150 x g pendant 5 minutes à température ambiante.
6. Eliminer le surnageant par aspiration.
7. Resuspendre le culot cellulaire dans 3 mL de PBS.
8. Répéter l'étape 5.
9. Eliminer le surnageant par aspiration et resuspendre le culot cellulaire dans:

0,5 mL ou 1 mL de PBS plus 0,1 % de formaldéhyde si les préparations doivent être conservées moins de 24 heures. (Un PBS avec 0,1 % de formaldéhyde peut être obtenu en diluant 12,5 µL de la solution de fixation IOTest 3 (REF A07800) car c'est sa concentration 10x dans 1 mL de PBS).

0,5 mL ou 1 mL de PBS sans formaldéhyde, si les préparations sont destinées à être analysées dans les 2 heures.

Nota Bene: Conserver les préparations entre 2 et 8 °C et à l'abri de la lumière.

VALEURS ATTENDUES

Chaque laboratoire doit établir une liste de valeurs de référence basée sur un groupe de donneurs sains appartenant à la population locale. Ceci doit être fait en tenant compte de l'âge, du sexe, de l'appartenance ethnique, ainsi que de toute autre différence régionale potentielle.

Dans nos laboratoires, le sang total de 10 adultes sains a été traité en utilisant le réactif décrit ci-dessus. Les résultats obtenus pour la numération des événements d'intérêt positifs avec ce réactif sont regroupés dans les tableaux ci-après :

Lymphocytes	Nombre	Moy. (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monocytes	Nombre	Moy. (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulocytes	Nombre	Moy. (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

PERFORMANCES

Les données de performance sont obtenues suivant la procédure décrite précédemment sur des échantillons de sang âgé de 24 heures collecté auparavant dans des tubes stériles avec du sel d'EDTA comme anticoagulant. L'analyse est réalisée dans les 2 heures qui suivent l'immunomarquage.

SPECIFICITE

La molécule CD71, connue comme le récepteur de la transferrine ou antigène T9, est une glycoprotéine transmembranaire homo-dimérique de 190 kDA (3). Par sa liaison à la transferrine, le CD71 est impliqué dans la captation du fer (4). Il est exprimé par les réticulocytes, les précurseurs érythroïdes et les cellules endothéliales des capillaires du cerveau (4,5). Tous les autres types connus de cellules n'expriment le CD71 que lorsqu'ils commencent à proliférer (4).

L'anticorps monoclonal YDJ1.2.2 a été assigné au CD71 lors du 5e HLDA Workshop sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains, de Boston, aux USA, en 1993 (WS Code: A006, Section: AA6) (3).

REPRODUCTIBILITE INTRA-LABORATOIRE

Le même jour et sur le même cytomètre, 12 déterminations du pourcentage de marquage d'une cible positive ont été menées. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Cible positive	Nombre	Moy. (%)	SD	CV (%)
Lymphocytes CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linéarité

Pour tester la linéarité du marquage de ce réactif, une lignée cellulaire positive ((JURKAT)) et une lignée cellulaire négative ((FRN3,4,14)) ont été mélangées en différentes proportions et à quantité cellulaire finale constante, de manière à ce que le rapport lignée positive / lignée négative du mélange s'échelonne de 0 à 100 %.

Des aliquotes ont été marquées selon la procédure décrite ci-dessus et la régression linéaire entre valeurs attendues et valeurs observées a été calculée.

Spécificité	Régression linéaire	Linéarité (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

LIMITES

1. Les résultats de cytométrie en flux peuvent être erronés si le cytomètre n'est pas parfaitement aligné, les fuites de fluorescence ne sont pas correctement compensées et les régions de délimitation ne sont pas soigneusement placées.
2. Utiliser de préférence une technique de lyse des globules rouges avec lavage car ce réactif n'a pas été optimisé pour les techniques de lyse dites "sans lavage".
3. On obtiendra des résultats précis et reproductibles dans la mesure où les procédures utilisées sont conformes aux instructions des fiches techniques et compatibles avec les bonnes pratiques de laboratoire.
4. L'anticorps conjugué de ce réactif est calibré afin d'offrir le meilleur rapport signal spécifique/signal non spécifique. C'est pourquoi il est important de respecter le rapport volume du réactif/volume de l'échantillon pour chaque test.
5. Dans le cas de l'hyperleucocytose, diluer le sang dans du PBS afin d'obtenir une valeur d'environ 5×10^9 leucocytes/L (6).
6. Dans certains états pathologiques, telles qu'une grave insuffisance rénale ou une hémoglobinopathie, la lyse des érythrocytes peut être lente, incomplète ou même impossible. Dans ce cas, il est recommandé d'isoler les cellules mononucléées en utilisant un gradient de densité (Ficoll, par exemple) avant le marquage (7).

Voir l'annexe (APPENDIX) pour les illustrations (EXAMPLES) et la bibliographie (REFERENCES).

MARQUES

Beckman Coulter, le logo stylisé et les marques des produits et des services Beckman Coulter mentionnées ici sont des marques ou des marques déposées de Beckman Coulter, Inc. aux États-Unis et dans d'autres pays.

Légende des symboles

Glossaire des symboles disponibles sur la page beckman.com/techdocs (document numéro B60062)

	Spezifikationen
Spezifität	CD71
Klon	YDJ1.2.2
Hybridom	X63 x balb/c
Immunogen	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Immunglobulin	IgG1
Art	Maus
Reinigung	Affinitätschromatographie
Fluorochrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Molares Verhältnis	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
Anregungs-λ	488 nm nm
Emissionspeak	525 nm nm
Puffer	PBS pH 7,2 plus 2 mg / mL BSA und 0,1 % NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 µL / Test

In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Dieser mit einem Fluorochrom konjugierte Antikörper dient zur Identifikation und Zählung im Durchflusszytometer von CD71-Antigen exprimierenden Zellpopulationen in menschlichen biologischen Proben.

PRINZIP

Dieser Test beruht auf der Fähigkeit von spezifischen monoklonalen Antikörpern, sich mit Hilfe der von den Leukozyten exprimierten Antigen determinanten spezifisch an die Leukozyten zu binden.

Die spezifische Markierung der Leukozyten erfolgt durch Inkubation der Probe mit dem IOTest-Reagenz. Die Erythrozyten werden anschließend durch eine Lyse eliminiert. Die von diesem Prozess verschonten Leukozyten werden im Durchflusszytometer untersucht.

Das Durchflusszytometer misst die Lichtverteilung sowie die Fluoreszenz der Zellen. Dabei wird die Target-Population innerhalb eines in einem Histogramm definierten elektronischen Fensters untersucht, das die Seitwärtslichtstreuung ("Side Scatter" oder SS) sowie die Vorwärtslichtstreuung ("Forward Scatter" oder FS) wiedergibt. Je nach vom Bediener gewählter Anwendung sind auch andere Histogramme, die zwei der am Zytometer vorhandenen Parameter kombinieren, als Grundlage zum elektronischen Gating möglich.

Die Fluoreszenz der so abgegrenzten Zellen wird zur Unterscheidung der positiv markierten Ereignisse von den nicht markierten Ereignissen analysiert. Die Ergebnisse werden in Prozentzahlen positiver Ereignisse in Bezug auf alle im elektronischen Fenster berücksichtigten Ereignisse ausgedrückt.

BEISPIELE KLINISCHER ANWENDUNGEN

Der Transferrinrezeptor (CD71) wird in proliferierenden Zellen exprimiert, einschließlich neoplastischer Zellen, aktivierter Lymphozyten und hämatopoetischer Präkursor-Zellen. CD71-Expression wurde sowohl für immunphänotypisches Clustering von myelodysplastischen Syndromen (1) als auch für die Unterscheidung zwischen fetalen und mütterlichen Zellen (2) verwendet.

REAGENZIEN

Konzentration: Siehe chargenspezifisches Analysezertifikat unter www.beckmancoulter.com.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Das Reagenz nicht über das Haltbarkeitsdatum hinaus anwenden.
2. Nicht einfrieren.
3. Vor der Anwendung auf Raumtemperatur (18 – 25 °C) erwärmen lassen.
4. Lichteinstrahlung auf ein Minimum begrenzen.
5. Kontamination durch Mikroorganismen der Reagenzien vermeiden. Dies könnte zu falschen Ergebnissen führen.
6. Antikörperlösungen, die Natriumazid (NaN₃) enthalten, sollten vorsichtig behandelt werden. Verschlucken und jeglichen Kontakt mit der Haut, den Schleimhäuten und den Augen vermeiden.
Zudem kann Natriumazid in einem sauren Medium potentiell gefährliches Azoimid bilden. Zur Entsorgung wird empfohlen, das Reagenz in einer großen Menge Wasser zu verdünnen und es anschließend in den Abfluss zu gießen. So kann eine Anhäufung von Natriumazid in den Metallleitungen vermieden und einer Explosionsgefahr vorgebeugt werden.
7. Jede Blutprobe muss als potentiell infektiös betrachtet und daher mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden (insbesondere Tragen von Handschuhen, Kittel und Schutzbrille).
8. Nie mit dem Mund pipettieren und jeglichen Kontakt der Proben mit der Haut, den Schleimhäuten und den Augen vermeiden.
9. Die Blutröhrchen und das zur Handhabung verwendete Einwegmaterial müssen in zur Verbrennung vorgesehenen ad hoc-Containern entsorgt werden.
10. Reagenzien und Abfall müssen entsprechend den lokalen Richtlinien entsorgt werden.

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Nicht als gefährlich eingestuft

SDS	Das Sicherheitsdatenblatt ist auf beckman.com/techdocs verfügbar.
------------	---

LAGERUNG UND STABILITÄT

Die flüssigen konjugierten Formen werden vor und nach Öffnen des Fläschchens bei 2 bis 8 °C vor Lichteinstrahlung geschützt aufbewahrt.

Stabilität des geschlossenen Fläschchens: siehe Haltbarkeitsdatum des Reagenzes auf dem Fläschchen.

Stabilität des geöffneten Fläschchens: das Reagenz ist 180 Tage lang stabil.

PROBEN

Die Blutabnahmen von venösem Blut müssen mit sterilen Röhrchen vorgenommen werden, die ein EDTA-Salz als gerinnungshemmende Substanz enthalten.

Die Proben müssen bei Raumtemperatur (18 –25 °C) und ruhend aufbewahrt werden. Vor Durchführung des Tests wird empfohlen, die Probe durch leichtes Schütteln zu homogenisieren.

Die Proben müssen innerhalb von 24 Stunden nach der Probeentnahme analysiert werden.

VERFALLSANZEICHEN

Jegliche Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Reagenzien kann auf eine Alterung hinweisen, das Reagenz sollte dann nicht mehr verwendet werden.

Wenn die Verpackung beschädigt ist oder die erhaltenen Daten irgendwelche Leistungsänderungen anzeigen, kontaktieren Sie Ihren lokalen Vertriebs Händler oder wenden sich an folgende E-Mail-Adresse: immuno-techsup@beckmancoulter.com

INHALT

Natriumazid als Konservierungsmittel kann in metallischen Abflussleitungen explosive Verbindungen eingehen. Siehe hierzu NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazards (das Bulletin bezüglich explosiver Säuren des US-amerikanischen Instituts für Sicherheit am Arbeitsplatz) (16.08.1976).

Um eine mögliche Akkumulation von Azidverbindungen zu vermeiden, die Abwasserrohre nach der Entsorgung des unverdünnten Reagenzes mit Wasser spülen. Natriumazid muss entsprechend den örtlichen behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENE ARTIKEL:

- Röhrchen zur Blutabnahme und weiteres für die Blutabnahme erforderliches Material.
- Automatische Pipetten mit Einwegspitzen für 20, 100 und 500 µL.
- Hämolyseröhrchen aus Kunststoff.
- Lyse-reagenz für Erythrozyten mit Waschschrift nach der Lyse. Zum Beispiel: VersaLyse (Art. A09777).
- Fixationsreagenz für Leukozyten. Zum Beispiel: IOTest 3 Fixationslösung
- Isotypkontrolle FITC : IOTest-Reagenz (Art. A07795.).
- Puffer (PBS: 0,01 M Natriumphosphat; 0,145 M Natriumchlorid; pH 7,2).
- Zentrifuge.
- Automatischer Rüttler (Typ Vortex).
- Durchflusszytometer.

VERFAHREN mit VERSALYSE-REAGENZ

HINWEIS: Das nachfolgende Verfahren gilt für Standardanwendungen. Die Probe- und/oder VersaLyse-Mengen können bei einigen Beckman Coulter-Anwendungen abweichen. In diesem Fall sind die Anleitungen des technischen Datenblatts der Anwendung zu befolgen.

Für jede getestete Probe zusätzlich zum Teströhrchen ein Kontrollröhrchen vorsehen, in dem die Zellen mit der Isotypkontrolle in Kontakt gebracht werden (Art. A07795.).

1. 20 µL des spezifischen, konjugierten IOTest-Antikörpers in jedes Teströhrchen und 20 µL der Isotypkontrolle in jedes Kontrollröhrchen geben.
2. In beiden Röhrchen 100 µL der zu testenden Probe hinzufügen. Leicht rütteln (Vortex).
3. 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur (18 –25 °C) und vor Lichteinstrahlung geschützt inkubieren.
4. Falls erforderlich eine Erythrolyse durchführen und dabei die Anleitungen des angewendeten Lyse-reagenzes befolgen. Wenn Sie z. B. VersaLyse (Art. A09777) verwenden möchten, sollten Sie sich nach der Anleitung richten und am besten das Verfahren "mit gleichzeitiger Fixation" anwenden, das darin besteht 1 mL der frisch zubereiteten "Fix-and-Lyse"-Mischung hinzufügen. Sofort eine Sekunde lang rütteln und 10 Minuten bei Raumtemperatur und vor Lichteinstrahlung geschützt inkubieren. Wenn die Probe keine roten Blutkörperchen enthält, 2 mL PBS hinzufügen.
5. 5 Minuten bei 150 x g und Raumtemperatur zentrifugieren.
6. Überstände durch Absaugen entfernen.
7. Zellpellet in 3 mL PBS resuspendieren.
8. Schritt 5 wiederholen.
9. Überstände durch Absaugen entfernen und Zellpellet resuspendieren in:

0,5 mL oder 1 mL PBS plus 0,1 % Formaldehyd, wenn die Präparate weniger als 24 Stunden erhalten werden sollen. (0,1 % Formaldehyd-PBS kann durch Verdünnen von 12,5 µL der IOTest 3-Fixierlösung (REF A07800) bei 10 x Konzentration in 1 mL PBS erhalten werden.)

0,5 mL oder 1 mL PBS ohne Formaldehyd, wenn die Proben innerhalb von 2 Stunden getestet werden.

HINWEIS: Die Proben müssen zwischen 2 und 8 °C und vor Lichteinstrahlung geschützt aufbewahrt werden.

ERWARTETE WERTE

Jedes Labor muss eine Liste von Referenzwerten erstellen, die auf einer Gruppe von gesunden Spendern aus der lokalen Population beruht. Dies hat unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, ethnischer Zugehörigkeit sowie allen anderen potentiellen regionalen Unterschieden zu erfolgen.

In unseren Laboren wurde Vollblut von 10 gesunden Erwachsenen unter Anwendung des oben beschriebenen Reagenzes behandelt. Die mit diesem Reagenz für die Zählung der relevanten positiven Ereignisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst :

Lymphozyten	Referenznummer	Durchschnitt (%)	SA	VK (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monozyten	Referenznummer	Durchschnitt (%)	SA	VK (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulozyten	Referenznummer	Durchschnitt (%)	SA	VK (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

LEISTUNG

Die Leistungsdaten wurden mit der oben beschriebenen Prozedur aus 24 h alten Blutproben ermittelt, die in sterilen Röhrchen mit EDTA-Salz als Antigenermittlungsmittel gesammelt wurden. Die Analyse wird innerhalb von 2 Stunden nach dem Immunostaining durchgeführt.

SPEZIFITÄT

Das CD71-Molekül, auch als Transferrin-Rezeptor oder T9-Antigen bekannt, ist ein homodimeres Transmembran-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 190 kDa (3). CD71 ist bei der Eisenaufnahme durch die Bindung von Transferrin beteiligt (4). Es wird durch Retikulozyten, Erythroid-Präkursoren und kapilläre Endothelzellen im Gehirn exprimiert (4,5). Alle anderen bekannten Zelltypen exprimieren CD71 nur zu Beginn der Proliferation (4).

Der monoklonale Antikörper YDJ1.2.2 wurde im Jahr 1993 anlässlich des 5. HLDA Workshop (Human Leucocyte Differentiation Antigen) in Boston, USA, dem CD71 zugeordnet (WS Code: A006, Sektion: AA6) (3).

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES LABORS

Am gleichen Tag und am gleichen Zytometer wurden 12 prozentuale Analysen der Markierung eines Positiv-Targets durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Positiv-Target	Referenznummer	Durchschnitt (%)	SA	VK (%)
Lymphozyten CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linearität

Zum Testen der Markierungslinearität dieses Reagenzes wurden eine positive ((JURKAT)) und eine negative ((FRN3,4,14)) Zellpopulation in unterschiedlichen Proportionen, jedoch bei gleichbleibender endgültiger Zellmenge vermischt, so dass sich das Verhältnis zwischen positiver und negativer Population der Mischung zwischen 0 und 100 % bewegt.

Es wurden gemäß dem vorausgehend beschriebenen Verfahren Aliquote markiert und die lineare Regression zwischen den erwarteten und beobachteten Werten berechnet.

Spezifität	Lineare Regression	Linearität (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Durchflusszytometrie kann falsche Ergebnisse liefern, wenn das Zytometer nicht richtig justiert wurde, die Fluoreszenzlecks nicht richtig kompensiert wurden und die Regionen nicht richtig positioniert sind.
2. Vorzugsweise sollte eine Lysetechnik der Erythrozyten mit Waschschrritten angewendet werden, da dieses Reagenz nicht für Lysetechniken ohne Waschschrritte optimiert wurde.
3. Genaue und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn die angewendeten Verfahren den Anleitungen der Datenblätter und der richtigen Laborpraxis entsprechen.
4. Der konjugierte Antikörper dieses Reagenzes wird so kalibriert, dass das beste spezifische/nicht-spezifische Signalverhältnis erzielt wird. Deshalb ist es wichtig, das Verhältnis Reagenz-/Probenvolumen in jedem Test einzuhalten.
5. Im Falle einer Hyperleukozytose, verdünnen Sie das Blut in PBS, bis Sie einen Wert von ca. 5×10^9 Leukozyten/l erhalten (6).
6. Bei bestimmten Krankheitsbildern, wie beispielsweise schwerem Nierenversagen oder Hämoglobinopathien kann die Lyse der Erythrozyten langsam, unvollständig oder gar nicht ablaufen. In diesem Fall wird empfohlen, die mononukleären Zellen mithilfe eines Dichtegradienten (z. B. Ficoll) vor dem Färben zu isolieren (7).

Darstellungen (EXAMPLES) und Literaturhinweise (REFERENCES) siehe Anhang (APPENDIX).

HANDELSMARKEN

Beckman Coulter, das stilisierte Logo und die in diesem Dokument erwähnten Beckman Coulter-Produkt- und -Dienstleistungsmarken sind in den USA und anderen Ländern eingetragene Marken von Beckman Coulter, Inc.

Liste der Symbole

Das Glossar der Symbole ist auf beckman.com/techdocs (Dokumentnummer B60062) verfügbar.

	Caratteristiche
Specificità	CD71
Clone	YDJ1.2.2
Ibridoma	X63 x balb/c
Immunogeni	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Immunoglobulina	IgG1
Specie	Topo
Purificazione	cromatografia di affinità
Fluorocromo	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
rapporto molare	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ d'eccitazione	488 nm
Picco d'emissione	525 nm
Tampone	PBS pH 7,2 addizionato con 2 mg / mL di BSA e lo 0,1% di NaN ₃

IO Test Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 µL / test

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

Questo anticorpo coniugato a un fluorocromo consente l'identificazione e la numerazione delle popolazioni cellulari che esprimono l'antigene CD71, presenti nei campioni biologici umani analizzati in citometria a flusso.

PRINCIPIO

Il principio sul quale si basa questo test è la capacità degli anticorpi monoclonali specifici di fissarsi su alcune cellule leucocitarie mediante i determinanti antigenici che esse esprimono.

La marcatura specifica dei leucociti avviene tramite l'incubazione del campione con il reagente IO Test. Successivamente, gli eritrociti vengono eliminati tramite lisi e i leucociti, non coinvolti in questa fase, vengono analizzati in citometria a flusso.

Il citometro a flusso misura la diffusione della luce nonché la fluorescenza delle cellule. Questo strumento consente di circoscrivere la popolazione interessata all'interno di una finestra di analisi in un istogramma che correla la diffusione ortogonale della luce ("Side Scatter" o SS) alla diffusione assiale ("Forward Scatter" o FS). Gli istogrammi, che correlano due dei parametri disponibili sul citometro, costituiscono un supporto alla fase di gating in funzione dell'applicazione scelta dall'utente.

La fluorescenza delle cellule circoscritte viene analizzata per distinguere le cellule marcate da quelle non marcate. I risultati sono espressi in percentuale di eventi positivi rispetto all'insieme degli eventi acquisiti dal gating.

ESEMPI DI APPLICAZIONI CLINICHE

Il recettore della transferrina (CD71) è espresso sulle cellule proliferanti incluso le cellule neoplastiche, sui linfociti attivati e sulle cellule ematopoietiche precorritrici. L'espressione del CD71 è stata utilizzata per il raggruppamento immunofenotipico delle sindromi mielodisplastiche (1) nonché per la discriminazione fetale delle cellule materne (2).

REAGENTI

Concentrazione: vedere il certificato di analisi specifico per il lotto su www.beckmancoulter.com.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Non utilizzare il reagente dopo la data di scadenza.
2. Non congelare.
3. Attendere che il flacone raggiunga la temperatura ambiente (18 – 25 °C) prima di utilizzarlo.
4. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce.
5. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti onde evitare l'apparizione di risultati errati.
6. Le soluzioni anticorpali che contengono sodio azide (NaN₃) devono essere maneggiate con cura. Non ingerire ed evitare il contatto con la pelle, le mucose e gli occhi.
Inoltre, in un mezzo acido, sodio azide può formare il pericoloso acido idrazoico. Se si presenta la necessità di smaltirlo, si raccomanda di diluire il reagente in una grande quantità di acqua prima di versarlo nel sistema di drenaggio per evitare l'accumulo di sodio azide nelle tubature di metallo e prevenire il rischio di esplosione.
7. Ogni singolo campione di sangue deve essere considerato potenzialmente infettivo e deve essere manipolato seguendo le apposite precauzioni d'uso (in particolare, si raccomanda di indossare guanti, camice e occhiali protettivi).
8. Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto dei campioni con la pelle, le mucose e gli occhi.
9. Le provette di sangue e il materiale usa e getta utilizzato per la manipolazione devono essere smaltiti in appositi recipienti destinati all'incenerimento.
10. Reagenti e rifiuti devono essere eliminati in conformità alle normative in vigore.

CLASSIFICAZIONE PERICOLI GHS

Classificato non pericoloso

SDS	La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs
------------	--

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Le forme liquide coniugate devono essere conservate a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce, prima e dopo l'apertura della fiala.

Stabilità flacone chiuso: vedere la data di scadenza del reagente indicata sul flacone.

Stabilità di una fiala aperta: il reagente è stabile per 180 giorni.

CAMPIONI

Il sangue venoso da analizzare deve essere messo in provette sterili contenenti EDTA come anticoagulante.

I campioni vanno conservati a temperatura ambiente (18 – 25 °C) senza agitare. Prima di effettuare il test, si raccomanda di omogeneizzare il contenuto della provetta agitandola leggermente.

I campioni devono essere analizzati entro 24 ore dal prelievo.

INDICI DI DETERIORAMENTO

Qualsiasi cambiamento nell'aspetto fisico dei reagenti potrebbe indicare un deterioramento; in tal caso, il reagente non deve essere utilizzato.

In caso di deterioramento dell'imballaggio o se i dati ottenuti presentano alcune alterazioni nelle prestazioni, rivolgersi al distributore locale o inviare un'e-mail al seguente indirizzo:

SOMMARIO

Il conservante sodio azide può formare composti esplosivi nelle tubazioni metalliche di scarico. Vedere il NIOSH Bulletin: "Explosive Azide Hazard" (Bollettino NIOSH: Rischi di esplosione dovuti al sodio azide) (16/8/1976).

Per evitare il possibile accumulo di azidi, lavare i tubi di scarico con acqua dopo lo smaltimento del reagente puro. Il sodio azide deve essere smaltito in conformità alle norme di legge locali applicabili.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT

- Provette per prelievo e materiale necessario ai prelievi.
- Pipette automatiche con puntali monouso per 20, 100 e 500 µL.
- Provette di plastica per effettuare l'emolisi.
- Reagente di lisi degli eritrociti con lavaggio successivo alla lisi. A titolo di esempio: VersaLyse (Rif. A09777).
- Reagente fissante dei leucociti: A titolo di esempio: Soluzione Fissante IOtest 3
- Controllo isotipico FITC : reagente IOtest (Rif. A07795.).
- Tampone (PBS: 0,01 M fosfato di sodio; 0,145 M cloruro di sodio; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Agitatore automatico (tipo Vortex).
- Citometro a flusso.

PROCEDURA con REAGENTE VERSALYSE

N.B.: La procedura seguente è valida per delle applicazioni standard. I volumi di campione e/o di VersaLyse per certe applicazioni Beckman Coulter possono essere diversi. In questo caso, seguire le istruzioni della scheda tecnica di applicazione.

Per ogni campione analizzato, è necessario prevedere, oltre alla provetta test, 1 provetta di controllo nella quale saranno messe le cellule in presenza del controllo isotipico (Rif. A07795.).

1. Aggiungere 20 µL di anticorpi coniugati IOtest in ciascuna provetta e 20 µL di controllo isotipico in ciascuna provetta di controllo.
2. Aggiungere 100 µL del campione da testare nelle 2 provette. Agitare delicatamente nell'agitatore.
3. Incubare per 15 - 20 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C) e al riparo dalla luce.
4. Se necessario, procedere alla lisi dei globuli rossi attenendosi alle raccomandazioni del reagente di lisi utilizzato. A titolo di esempio, qualora si desiderasse utilizzare VersaLyse (Rif. A09777), vedere la scheda tecnica e seguire preferibilmente la procedura « con fissaggio concomitante » che consiste nell'aggiungere 1 mL di una miscela di "Fix-and-Lyse", preparata estemporaneamente. Agitare immediatamente al Vortex per un secondo e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Se il campione non contiene globuli rossi, aggiungere 2 mL di PBS.
5. Centrifugare per 5 minuti a 150 x g e a temperatura ambiente.
6. Eliminare il surnatante tramite aspirazione.
7. Risospendere il pellet (fondello) cellulare in 3 mL di PBS.
8. Ripetere il punto 5.
9. Eliminare il surnatante tramite aspirazione e risospendere il pellet cellulare in:
0,5 mL o 1 mL di PBS più 0,1% di formaldeide, se i preparati devono essere conservati meno di 24 ore. (È possibile ottenere PBS con formaldeide allo 0,1% diluendo 12,5 µL di soluzione fissante IOtest 3 (REF A07800) alla concentrazione di 10x in 1 mL di PBS).
0,5 o 1 mL di PBS senza formaldeide, se i preparati devono essere analizzati entro 2 ore.

N.B.: In ogni caso, conservare i preparati a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce.

VALORI ATTESI

Ogni laboratorio deve redigere un elenco di valori di riferimento basato su un gruppo di donatori sani appartenenti alla popolazione locale. Ciò deve essere fatto tenendo conto dell'età, del sesso, dell'appartenenza etnica e di qualsiasi altra potenziale differenza regionale.

Nei nostri laboratori, sono stati analizzati i campioni di sangue intero di 10 soggetti adulti sani utilizzando il reagente sopra descritto. Nelle seguenti tabelle sono riportati i risultati ottenuti con questo reagente per la numerazione dei casi risultati positivi :

Linfociti	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

No Translation Available	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulociti	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

CARATTERISTICHE PROCEDURALI

I dati relativi alla performance sono ottenuti utilizzando la procedura sopra descritta su campioni di sangue raccolti da 24 ore in provette sterili, utilizzando un sale di EDTA come anticoagulante. L'analisi è effettuata entro le 2 ore successive all'immunostaining.

SPECIFICITÀ

La molecola CD71, detta anche recettore della transferrina o antigene T9, è una glicoproteina omodimerica transmembranale di 190 kDa (3). Il CD71 è coinvolto nella captazione del ferro attraverso un legame con la transferrina (4). È espresso dai reticulociti, precursori eritroidi e dalle cellule endoteliali capillari del cervello (4,5). Tutti gli altri tipi di cellule conosciute esprimono il CD71 soltanto quando entrano nella fase di proliferazione (4).

L'anticorpo monoclonale YDJ1.2.2 è stato assegnato al CD71 durante il 5° HLDA Workshop on Human Leucocytes Differentiation Antigens tenutosi a Boston, Stati Uniti, nel 1993 (WS Code: A006, Section: AA6) (3).

RIPRODUCIBILITÀ INTRALABORATORIO

Lo stesso giorno e con lo stesso citometro, sono state effettuate 12 determinazioni della percentuale di marcatura di un target positivo. Nelle seguenti tabelle sono riportati i risultati ottenuti:

Target positivo	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
Linfociti CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linearit

Per testare la linearità di marcatura di questo reagente, sono state mescolate, in proporzioni diverse pur mantenendo costante il numero totale di cellule, una linea cellulare positiva ((JURKAT)) e una linea cellulare negativa ((FRN3,4,14)). Il rapporto linea cellulare positiva / negativa fornisce un dato lineare ordinabile su una scala da 0 a 100%.

Alcune aliquote sono state testate in base alla procedura descritta sopra. È stata inoltre calcolata la regressione lineare tra valori attesi e valori osservati.

Specificità	Regressione lineare	Linearità (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

LIMITAZIONI

1. I risultati delle analisi in citometria a flusso potrebbero rivelarsi errati qualora non si fosse provveduto al perfetto allineamento del citometro, alla corretta compensazione delle fluorescenze e al preciso posizionamento delle regioni da analizzare.
2. È preferibile utilizzare una tecnica di lisi degli eritrociti con lavaggio perché il reagente non è stato ottimizzato per le cosiddette tecniche di lisi "senza lavaggio".
3. Si otterranno risultati precisi e riproducibili a condizione che le procedure applicate siano conformi alle istruzioni riportate nelle schede tecniche e compatibili con le buone pratiche di laboratorio.
4. L'anticorpo coniugato di questo reagente è calibrato in modo tale da offrire il miglior rapporto segnale specifico/segnale non specifico. È dunque importante mantenere per ogni test il rapporto volume del reagente/volume del campione.
5. In caso di iperleucocitosi, diluire il sangue in PBS fino ad ottenere un valore di circa 5×10^9 leucociti/L (6).
6. In alcuni stati patologici, come ad esempio insufficienza renale grave o emoglobinopatie, la lisi degli eritrociti può essere lenta, incompleta o persino impossibile. In tal caso, è consigliabile isolare le cellule mononucleate mediante gradiente di densità (ad esempio, Ficoll) prima della colorazione (7).

Per le illustrazioni (EXAMPLES) e la bibliografia (REFERENCES), consultare l'allegato (APPENDIX).

MARCHI COMMERCIALI

Beckman Coulter, il logo stilizzato ed i marchi commerciali dei prodotti e servizi di Beckman Coulter menzionati qui, sono marchi commerciali o marchi commerciali registrati di Beckman Coulter, Inc., negli Stati Uniti e in altri paesi.

Elenco descrizioni simboli

Il Glossario dei simboli è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs (documento numero B60062)

	Especificaciones
Especificidad	CD71
Clon	YDJ1.2.2
Hibridoma	X63 x balb/c
Inmunógeno	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Inmunoglobulina	IgG1
Especie	Ratón
Purificación	Cromatografía de afinidad
Fluorocromo	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
relaci	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ de excitación	488 nm
Pico de emisión	525 nm
Tampón	PBS pH 7,2 al que se le adicionan 2 mg / mL de BSA y 0,1 % NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 µL /
determinación

Para uso diagnóstico *in vitro*

INDICACIONES

Este anticuerpo conjugado a un fluorocromo permite la identificación y la numeración de las poblaciones celulares que expresan el antígeno CD71 presentes en muestras biológicas humanas por citometría de flujo.

PRINCIPIO

Esta determinación se basa en la capacidad de los anticuerpos monoclonales específicos de unirse a células leucocitarias mediante los determinantes antigénicos que éstas expresan.

El marcaje específico de los leucocitos se realiza incubando la muestra con el reactivo IOTest. Los eritrocitos son eliminados a continuación por lisis, y los leucocitos, no afectados por esta etapa, son analizados por citometría de flujo.

El citómetro de flujo mide la dispersión de la luz y la fluorescencia de las células. Permite acotar la población de interés dentro de una ventana electrónica, definida en un histograma que correlaciona la dispersión lateral de luz ("Side Scatter" o SS) con la dispersión frontal de luz ("Forward Scatter" o FS). También pueden utilizarse como apoyo para la fase de creación de una ventana electrónica otros histogramas que combinen dos de los distintos parámetros disponibles en el citómetro en función de la aplicación elegida por el usuario.

La fluorescencia de las células así acotadas se analiza para distinguir los eventos con tinción positiva de los eventos no marcados. Los resultados se expresan en porcentaje de eventos positivos con relación al conjunto de los eventos acotados en la selección electrónica por ventanas.

EJEMPLOS DE APLICACIONES CLÍNICAS

El receptor de transferrina (CD71) se expresa sobre células proliferativas, como células neoplásicas, linfocitos activados y células precursoras hematopoyéticas. La expresión de CD71 ha sido utilizada para el agrupamiento inmunofenotípico de síndromes mielodisplásicos (1), así como para discriminar entre células fetales y maternas (2).

REACTIVOS

Concentración: ver el certificado de análisis específico del lote en www.beckmancoulter.com.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. No utilizar el reactivo después de la fecha de caducidad.
2. No congelar.
3. Esperar a que esté a la temperatura ambiente (18 – 25 °C) antes de utilizarlo.
4. Minimizar el tiempo de exposición a la luz.
5. La contaminación microbiana de los reactivos puede generar resultados erróneos.
6. Las soluciones de anticuerpos que contienen azida sódica (NaN₃) deben manipularse con precaución. No lo ingiera y evite cualquier contacto con la piel, las mucosas y los ojos.
Por otra parte, en medio ácido, la azida sódica puede formar ácido hidrazoico, que es potencialmente peligroso. Si es necesario eliminar el reactivo, se recomienda diluirlo en un gran volumen de agua antes de verterlo en las canalizaciones, para evitar la acumulación de azida sódica en las tuberías metálicas y el consiguiente riesgo de explosión.
7. Toda muestra de sangre debe considerarse como potencialmente infecciosa y manipularse con las precauciones de uso (en particular; utilización de guantes, bata y gafas protectoras).
8. No pipetear nunca con la boca y evitar todo contacto de las muestras con la piel, las mucosas y los ojos.
9. Los tubos de sangre y el material desechable que se hayan empleado durante la manipulación deben desecharse en contenedores específicos para la incineración.
10. Los reactivos y desechos deben eliminarse según los requisitos locales

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

No clasificado como tóxico

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los conjugados en forma líquida deben conservarse entre 2 y 8 °C en un lugar protegido de la luz, antes y después de abrir el frasco.

Estabilidad del frasco cerrado: véase la fecha de caducidad del reactivo indicada en el frasco.

Estabilidad del frasco abierto: el reactivo es estable durante 180 días.

MUESTRAS

Las muestras de sangre venosa deben recogerse en tubos estériles que contengan una sal de EDTA como anticoagulante.

Las muestras se conservan a temperatura ambiente (18 – 25°) sin agitación. Antes de efectuar el análisis de la muestra, se recomienda homogeneizarla mediante agitación suave.

Las muestras deben analizarse en las 24 horas siguientes a su obtención.

SIGNOS DE DETERIORO

Cualquier cambio en la apariencia física de los reactivos puede indicar deterioro. En tal caso, el reactivo no debe utilizarse.

En caso de deterioro del paquete o si los datos obtenidos indican una alteración del rendimiento, póngase en contacto con su distribuidor local o escriba a la siguiente dirección de correo electrónico:

CONTENIDOS

El conservante azida sódica puede formar compuestos explosivos en las tuberías metálicas de desagüe. Consulte el NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Boletín de NIOSH: Peligro de explosión con la azida) (16/08/1976).

Para evitar la posible acumulación de compuestos de azida, limpie con agua los tubos de desagüe tras la eliminación del reactivo sin diluir. Para desechar la azida sódica deben seguirse las normativas locales adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS:

- Tubos de recogida de muestra y material necesario para el procesamiento de las muestras.
- Pipetas automáticas con puntas desechables para 20, 100 y 500 µL.
- Tubos de hemólisis de plástico.
- Reactivo de lisis de los eritrocitos con etapa de lavado tras lisis. Por ejemplo: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reactivo de fijación de los leucocitos. Por ejemplo: Solución de Fijación IOTest 3
- Control isotópico FITC : reactivo IOTest (Ref. A07795.).
- Tampón (PBS: fosfato sódico 0,01 M; cloruro sódico 0,145 M; pH 7,2).
- Centrífuga.
- Mezclador automático (Tipo Vórtex).
- Citómetro de flujo.

PROCEDIMIENTO con EL REACTIVO VERSALYSE

Advertencia : El siguiente procedimiento es válido para aplicaciones estándar. Los volúmenes de muestra y/o de VersaLyse para algunas aplicaciones Beckman Coulter pueden ser diferentes. Si fuera el caso, seguir las instrucciones de la ficha técnica de la aplicación.

Para cada muestra analizada además del tubo problema, se debe incluir un tubo control en el que se incubarán las células con el control isotópico (Ref. A07795.).

1. Añada 20 µL de anticuerpo conjugado IOTest específico a cada tubo de ensayo y 20 µL del control isotópico a cada tubo de control.
2. Añadir 100 µL de la muestra que debe probarse en los 2 tubos. Mezclar suavemente en el Vórtex.
3. Incubar 15 a 20 minutos a temperatura ambiente (18 – 25 °C) y en un lugar protegido de la luz.
4. Proceder, si es necesario, a la lisis de los eritrocitos siguiendo las recomendaciones del reactivo de lisis utilizado. Por ejemplo, si se desea utilizar VersaLyse (Ref. A09777), consultar la ficha técnica y seguir preferentemente el procedimiento denominado "con fijación concomitante" que consiste en añadir 1 mL de la mezcla "Fix-and-Lyse" preparada extemporáneamente. Mezclar seguidamente en el Vórtex durante un segundo e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en un lugar protegido de la luz. Si la muestra no contiene eritrocitos, añadir 2 mL de PBS.
5. Centrifugar 5 minutos a 150 x g y a temperatura ambiente.
6. Eliminar el sobrenadante por aspiración.
7. Resuspender el botón celular en 3 mL de PBS.
8. Repetir la etapa 5.
9. Eliminar el sobrenadante por aspiración y resuspender el botón celular en:

0,5 mL o 1 mL de PBS más el 0,1 % de formaldehído si las preparaciones deben conservarse menos de 24 horas. (Se puede obtener un 0,1 % de PBS de formaldehído diluyendo 12,5 µL de solución fijadora IOTest 3 [REF A07800] a su concentración de 10x en 1 mL de PBS).

0,5 mL o 1 mL de PBS sin formaldehído si las preparaciones se analizan antes de 2 horas.

Advertencia: Conservar las preparaciones entre 2–8 °C en un lugar protegido de la luz

VALORES ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer una lista de valores de referencia basada en un grupo de donantes sanos que pertenecen a la población local. Esto debe hacerse teniendo en cuenta la edad, el sexo, el origen étnico, y cualquier otra posible diferencia regional.

En nuestros laboratorios, se trató la sangre entera de 10 adultos sanos, utilizando el reactivo mencionado anteriormente. Los resultados obtenidos para la numeración de los eventos de interés positivos con este reactivo se agrupan en la siguiente tabla :

Linfocitos	Número	Media (%)	DE	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

No Translation Available	Número	Media (%)	DE	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulocitos	Número	Media (%)	DE	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

RENDIMIENTO

Los datos de rendimiento se obtienen utilizando el procedimiento descrito más arriba en muestras de sangre de 24 horas de antigüedad, recogidas en tubos estériles con una sal de EDTA como anticoagulante. Los análisis se llevan a cabo en las dos horas siguientes al inmunomarcaje.

ESPECIFICIDAD

La molécula de CD71, conocida como receptor de transferrina o antígeno T9, es una glicoproteína homodimérica transmembrana de 190 kDa (3). CD71 está implicada en la absorción de hierro por unión a la transferrina (4). Se expresa mediante reticulocitos, precursores eritroides y células endoteliales capilares del cerebro (4,5). Todos los demás tipos conocidos de células expresan CD71 sólo cuando entran en proliferación (4).

El anticuerpo monoclonal YDJ1.2.2 fue asignado al CD71 en el transcurso del 5° HLDA Workshop sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos, celebrado en Boston, EE.UU., en 1993 (Código WS: A006, Sección: AA6) (3).

REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO

En el mismo día y en el mismo citómetro, se llevaron a cabo 12 determinaciones del porcentaje de tinción de una población positiva. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente:

Blanco positivo	Número	Media (%)	DE	CV (%)
Linfocitos CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linealidad

Para comprobar la linealidad del marcaje con este reactivo, se mezclaron una línea celular positiva ((JURKAT)) y una línea celular negativa ((FRN3,4,14)) en distintas proporciones para una concentración y a cantidad celular final constante, de modo que la proporción línea positiva/línea negativa de la mezcla fuera de 0 a 100 %.

Se procesaron las alícuotas según el procedimiento anteriormente descrito y se calculó la regresión lineal entre los valores esperados y los valores observados.

Especificidad	Regresión lineal	Linealidad (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

LIMITACIONES

- Los resultados de citometría de flujo pueden ser erróneos si el citómetro no se alinea perfectamente, las fluorescencias no se compensan correctamente y las ventanas de selección no se ajustan cuidadosamente.
- Utilizar preferentemente una técnica de lisis de los eritrocitos con lavado, ya que este reactivo no ha sido optimizado para las técnicas de lisis denominadas "sin lavado".
- Los resultados serán precisos y reproducibles en la medida en que los procedimientos utilizados sigan las instrucciones de las fichas técnicas y sean compatibles con las buenas prácticas de laboratorio.
- El anticuerpo conjugado de este reactivo está calibrado para ofrecer una relación señal específica/señal inespecífica óptima. Por ello, es importante respetar la proporción entre el volumen de reactivo y el volumen de muestra en cada determinación.
- En el caso de la hiperleucocitosis, diluya la sangre en PBS para obtener un valor de aproximadamente. 5×10^9 leucocitos/L (6).
- En algunos estados de enfermedad, por ejemplo con insuficiencia renal o hemoglobinopatías, la lisis de los hematíes puede ser lenta, incompleta o incluso imposible. En este caso, se recomienda aislar las células mononucleares utilizando un gradiente de densidad (Ficoll, por ejemplo) antes de la tinción (7).

Véase el Anexo (APPENDIX) para las ilustraciones (EXAMPLES) y la bibliografía (REFERENCES).

MARCAS COMERCIALES

Beckman Coulter, el logotipo estilizado y las marcas de productos y servicios de Beckman Coulter aquí mencionadas son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Beckman Coulter, Inc. en Estados Unidos y otros países.

Lista de símbolos

El glosario de símbolos está disponible en beckman.com/techdocs (número de documento B60062)

	Especificações
Especificidade	CD71
Clone	YDJ1.2.2
Hibridoma	X63 x balb/c
Imunogénio	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Imunoglobulina	IgG1
Espécie	Rato
Purificação	Cromatografia de Afinidade
Fluorocromo	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Razão molar	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ excitação	488 nm
Pico da Emissão	525 nm
Tampão	PBS pH 7.2 mais 2 mg / mL BSA e 0,1% NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 μ L / teste

Para fins de diagnóstico *in vitro*

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Este anticorpo conjugado com fluorocromo permite a identificação e numeração das populações das células que expressão o antígeno CD71 presente em amostras biológicas humanas utilizando a citometria de fluxo.

PRINCÍPIO

Este teste baseia-se na capacidade que têm os anticorpos monoclonais específicos para unir-se aos antígenos determinantes expressados por leucócitos.

A coloração específica dos leucócitos é realizada incubando a amostra com o reagente IOTest. Os glóbulos vermelhos são, deste modo, removidos por lise e os leucócitos, os quais não são afectados por este procedimento, são analisados por citometria de fluxo.

O citómetro mede a difusão de luz e a fluorescência das células. Possibilita a delimitação da população de interesse na janela electrónica definida pelo histograma, a qual correlaciona a difusão ortogonal da luz (Side Scatter ou SS) e a difusão dum estreito ângulo de luz (Forward Scatter ou FS). Outros histogramas que juntam dois dos diferentes parâmetros disponíveis no citómetro podem também ser usados como ajuda dependendo da aplicação escolhida pelo utilizador.

A fluorescência das células delimitadas é analisada para distinguir os eventos corados positivamente dos não corados. Os resultados são expressos como a percentagem de eventos positivos em relação a todos os eventos adquiridos pela aquisição electrónica.

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES CLÍNICAS

O receptor da transferrina (CD71) é expresso em células proliferantes, incluindo células neoplásticas, linfócitos activados e células precursoras hematopoiéticas. A expressão do CD71 tem sido utilizada para clustering imunofenotípico de síndromas mielodisplásticos (1), assim como para a discriminação entre as células fetais e as maternas (2).

REAGENTES

Concentração : Consulte o certificado de análise específica do lote em www.beckmancoulter.com.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não use o reagente após a data de expiração.
2. Não refrigere.
3. Deixe atingir a temperatura ambiente antes de usar (18 – 25 °C) .
4. Evite a exposição à luz.
5. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, podem obter-se falsos resultados.
6. As soluções de anticorpos contendo azida sódica (NaN₃) devem ser manipuladas com cuidado. Não utilize para uso interno e evite o contacto com a pele, mucosas e olhos. Além disso, em meio ácido, a azida sódica pode formar o ácido hidrazoico potencialmente perigoso.
Para evitar esta possibilidade, recomenda-se que o reagente seja diluído num grande volume de água antes de coloca-lo no sistema de drenagem para evitar a acumulação da azida sódica nos tubos de metal e para prevenir o risco de explosão.
7. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infecciosas e devem ser manipuladas com cuidado (em particular: uso de luvas, fatos e óculos).
8. Nunca pipetar com a boca e evitar qualquer contacto das amostras com a pele, mucosa e olhos.
9. Os tubos de sangue e qualquer material descartável usado na manipulação, deve ser descartado num frasco especial fechado para incineração.
10. Os reagentes e os desperdícios devem ser eliminados de acordo com os requisitos locais.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Não classificado como perigoso

SDS	A Ficha de dados de segurança está disponível em beckman.com/techdocs
------------	---

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A forma de líquidos conjugados deve ser mantida entre 2 e 8 °C e protegida da luz, antes e depois do frasco ter sido aberto.

Estabilidade do frasco fechado: ver data de expiração do frasco.

Estabilidade do tubo aberto: O reagente é estável durante 180 dias.

AMOSTRAS

Amostras de sangue devem ser colhidas utilizando tubos estéreis, contendo um sal de EDTA como anticoagulante.

As amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente (18 – 25 °C) e não devem ser agitadas. As amostras devem ser homogeneizadas por agitação suave antes de tomar a amostra do ensaio.

As amostras devem ser analisadas dentro das 24 horas seguintes à colheita.

EVIDÊNCIA DE DEGRADAÇÃO

Qualquer alteração no aspecto físico dos reagentes poderá indicar deterioração e o reagente não deverá ser utilizado.

No caso de deterioração da embalagem ou se os dados obtidos mostrarem alguma alteração no desempenho, contacte o distribuidor local ou utilize o seguinte endereço de e-mail:

ÍNDICE

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos em sistemas de canalizações metálicas. Consulte o boletim Explosive Azide Hazard (16-8-1976) (Perigos de explosão da azida) do NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health — Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional) norte-americano.

Para evitar a possível acumulação de compostos de azida, enxague as condutas de resíduos com água após o descarte do reagente não diluído. A eliminação de azida sódica deve ser efetuada de acordo com as normas locais apropriadas.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

- Tubos de ensaio e material necessário para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 20, 100 e 500 µL.
- Tubos plásticos de hemólise.
- Reagente de lise de glóbulos vermelhos com fase de lavagem depois da lise. Por exemplo: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagente de fixação de leucócitos: Por exemplo: Solução de Fixação IOTest 3 (Ref. A07800).
- Controlo Isotópico FITC : reagente IOTest (Ref. A07795.).
- Tampão (PBS: 0.01 M fosfato de sódio; 0.145 M cloreto de sódio; pH 7.2).
- Centrífuga.
- Agitador automático (tipo Vortex).
- Citómetro de fluxo.

PROCEDIMENTO com REAGENTE VERSALYSE

Nota: O procedimento descrito a seguir é válido para aplicações padrões. Os volumes das amostras e/ou do VersaLyse para algumas aplicações Beckman Coulter podem ser diferentes. Se este for o caso, seguir as instruções sobre as técnicas de aplicação dadas.

Por cada amostra a analisar requer-se, além do tudo teste, um tubo controlo no qual as células são misturadas na presença do controlo isotópico (Ref. A07795.).

1. Adicione 20 µL de anticorpo conjugado de IOTest específico em cada tubo de teste e 20 µL do controlo isotópico em cada tubo de controlo.
2. Adicione 100 µL de amostra teste a cada tubo. Agitar os tubos no vortex suavemente.
3. Incube por 15 a 20 minutos, à temperatura ambiente (18 – 25 °C), protegido da luz.
4. Realize a lise dos glóbulos vermelhos, caso for necessário, seguindo as recomendações do reagente de lise utilizado. Como exemplo, se deseja utilizar VersaLyse (Ref. A09777), consulte o folheto e siga preferivelmente o procedimento conhecido pelo nome “Com fixação concomitante” que consiste em adicionar 1 mL da mistura de “Fix-and-Lyse” preparada extemporaneamente, agitar imediatamente no vortex por 1 segundo e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Se a amostra não contiver glóbulos vermelhos, adicionar 2 mL de PBS.
5. Centrifugue durante 5 minutos a 150 x g à temperatura ambiente.
6. Remova o sobrenadante por aspiração.
7. Ressuspenda o pellet celular com 3 mL de PBS.
8. Repita o passo 5.
9. Remova o sobrenadante por aspiração e ressuspenda o pellet celular com:

0,5 mL ou 1 mL de PBS mais 0,1% de formaldeído se as preparações se destinarem a ser mantidas por menos de 24 horas. (É possível obter uma solução PBS com 0,1% de formaldeído diluindo 12,5 µL da solução fixadora IOTest 3 [REF A07800] à sua concentração de 10X em 1 mL de PBS).

0,5 mL ou 1 mL de PBS sem formaldeído, se as preparações vão ser analisadas em 2 horas.

Nota: Em todos os casos, mantenha as amostras entre 2 e 8 °C e protegidas da luz.

VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deve compilar uma lista de valores de referência baseados num grupo de dadores saudáveis, da população local. Deve ser feito tomando em conta a idade, sexo e grupo étnico assim como alguma outra potencial diferença regional.

Nos nossos laboratórios, o sangue total de 10 adultos saudáveis foi tratado utilizando o reagente anteriormente descrito. Os resultados obtidos sobre na contagem dos eventos positivos de interesse com este reagente são apresentados na seguinte tabela :

Linfócitos	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monócitos	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulócitos	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

DESEMPENHO

Os dados de realização são obtidos utilizando o procedimento descrito anteriormente nas amostras de sangue com 24 horas colhidas previamente em tubos estéreis com sal de EDTA como anticoagulante. A análise é executada no espaço de 2 horas a seguir à imuno-coloração.

ESPECIFICIDADE

A molécula CD71, conhecida como receptor da transferrina ou antigénio T9, é uma glicoproteína transmembranar homodimérica com 190 kDa (3). A CD71 está envolvida na fixação do ferro através da ligação da transferrina (4). Esta molécula é expressa por reticulócitos, por precursores de eritrócitos e por células de capilares endoteliais do cérebro (4,5). Todos os outros tipos de células apenas expressam a CD71 quando sofrem proliferação (4).

O anticorpo monoclonal YDJ1.2.2 foi atribuído ao CD71 no 5º HLDA Workshop (Human Leucocyte Differentiation Antigens), que decorreu em Boston, nos EUA, em 1993 (WS Code: A006, Section: AA6) (3).

REPRODUTIBILIDADE INTRA-LABORATÓRIO

No mesmo dia e utilizando o mesmo citómetro, foram processadas 12 medições da percentagem da coloração dum alvo positivo. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela seguinte:

Alvo positivo	Número	Média (%)	DP	CV (%)
Linfócitos CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linearidade

Para testar a linearidade da coloração deste reagente, misturaram-se uma linha celular positiva ((JURKAT)) e uma linha celular negativa ((FRN3,4,14)), em diferentes proporções com um número final constante de células, mas de modo que a razão linha positiva/linha negativa da mistura encontre-se dentro do intervalo 0 - 100%.

Foram coradas alíquotas utilizando o procedimento descrito sobre e foi calculada a regressão linear entre os valores observados e os esperados.

Especificidade	Regressão Linear	Linearidade (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

LIMITAÇÕES

1. A citometria de fluxo pode produzir falsos resultados se o citómetro não for alinhado perfeitamente, se o escape de fluorescência não for correctamente compensado e se as regiões não forem cuidadosamente posicionadas.
2. É preferível utilizar a técnica de lise dos glóbulos vermelhos com lavagem quando o reagente não foi optimizado pelas técnicas lise "sem lavagem".
3. Resultados seguros e reprodutíveis poderão ser obtidos na medida em que o procedimento usado esteja de acordo com a técnica descrita no folheto incluído e seja compatível com as boas práticas de laboratório.
4. O anticorpo conjugado deste reagente é calibrado de modo a oferecer a melhor razão sinal específico/sinal não específico. Por conseguinte, é importante aderir à razão de volume de reagente/volume da amostra em cada teste.
5. No caso de um hiperleucocitosis, dilua o sangue em PBS de modo a obter um valor de aproximadamente 5×10^9 leucócitos/L (6).
6. Em certos estados da doença, como falha renal grave ou hemoglobinopatias, a lise dos glóbulos vermelhos pode ser lenta, incompleta ou mesmo impossível. Neste caso, é recomendado o isolamento das células mononucleadas utilizando um gradiente de densidade (Ficoll, por exemplo) antes da coloração (7).

Ver apêndice (appendix) para obter exemplos (examples) e bibliografia (references).

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logótipo estilizado e as marcas de produtos e serviços supramencionados da Beckman Coulter são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e outros países.

Legenda dos símbolos

O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (número do documento B60062).

	Specifikation
Specificitet	CD71
Klon	YDJ1.2.2
Hybridom	X63 x balb/c
Immunogen	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Immunglobulin	IgG1
Art	Mus
Reningsmetod	Affinitetskromatografi
Fluorokrom	Fluorescein isothiocyante (FITC)
Molarförhållande	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ excitation	488 nm
Emissionstopp	525 nm
Buffert	PBS pH 7.2 plus 2 mg / mL BSA och 0,1 % NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 μ L / test

För *in vitro* diagnostiskt bruk

AVSEDD ANVÄNDNING

Med denna fluorokromkonjugerade antikropp kan man i humana biologiska prover med hjälp av flödescytometri identifiera och räkna cellpopulationer som uttrycker CD71-antigen.

PRINCIP

Testet är baserat på förmågan hos specifika monoklonala antikroppar att binda till de antigen-determinanter som uttrycks på leukocyter.

Specifik infärgning av leukocyterna utförs genom inkubering av provet med IOTest-reagenset. Erytrocyterna elimineras därefter genom lysering och leukocyterna, som inte påverkas av processen, analyseras med flödescytometri.

Flödescytometern mäter ljusspridningen och fluorescensen från cellerna. Med hjälp av den kan man avgränsa den intressanta populationen inom det elektroniska fönster som definierats på ett histogram, där den vinkelräta ljusspridningen (sidospredning, Side Scattering eller SS) avsatts mot smalvinkelspridningen (framåtspridning, Forward Scatter eller FS). Beroende på vald applikation kan man som hjälp i gating-steget använda andra histogram som kombinerar två av de olika parametrar som finns tillgängliga på cytometern.

Fluorescensen hos de avgränsade cellerna analyseras för att urskilja positivt inmärkta events från ej inmärkta sådana. Resultaten uttrycks i procent av positiva events i förhållande till alla events som insamlats i det elektroniska fönstret.

EXEMPEL PÅ KLINISKA TILLÄMPNINGAR

Transferrinreceptorn (CD71) uttrycks på prolifererande celler inklusive neoplastiska celler, aktiverade lymfocyter och hematopoetiska prekursorceller. Uttrycket av CD71 har använts för immunfenotypisk gruppering av myelodysplastiska syndrom (1) samt för att diskriminera mellan fetala och maternella celler (2).

REAGENSER

Koncentration: Se det batchspecifika analyscertifikatet på www.beckmancoulter.com.

VARNING OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- Använd inte reagenset efter utgångsdatum.
- Frys inte reagenset.
- Rumstemperera (18–25 °C) före användning.
- Minimera exponering för ljus.
- Undvik mikrobiell kontamination av reagenset, i annat fall kan missvisande resultat uppkomma.
- Antikroppslosningar som innehåller natriumazid (NaN₃) måste hanteras med försiktighet. Använd ej invärtes och undvik all kontakt med hud, slemhinnor och ögon.
Vidare kan natriumazid i sur miljö bilda den potentiellt skadliga syran väteazid. Om reagenset skall kasseras bör det spädas ut med stora mängder vatten innan det hålls ut i avloppet. På detta sätt undviker man explosionsrisk till följd av ansamling av natriumazid i avloppsroren.
- Alla blodprov måste behandlas som potentiellt infektiöst material och behandlas med försiktighet (tänk på: användning av skydds-handskar, -rockar och -glasögon).
- Pipettera aldrig med munnen och låt inte hud, slemhinnor eller ögon komma i kontakt med prover eller reagens.
- Blodrör och engångsmaterial som använd vid preparering ska kastas i där för avsedda kärl och brännas.
- Reagenser och avfall bör kasseras enligt lokala krav

RISKKLASSIFICERING ENLIGT GHS

Ej kategoriserad som farligt

SDS	Safety Data Sheet (Säkerhetsdatablad) finns på beckman.com/techdocs
------------	---

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Konjugerade lösningar måste förvaras vid 2 – 8 °C och skyddas mot ljus före och efter det att ampullen öppnats.

Stabilitet hos öppnad ampull: se utgångsdatum på ampullen.

Stabiliteten i öppen flaskan: reagenset är stabilt i 180 dagar.

PROVER

Venblod skall tas i sterila rör med EDTA som antikoagulant.

Proverna skall förvaras vid rumstemperatur (18–25 °C) och får inte skakas. Proverna skall homogeniseras genom att man skakar dem lätt före pipettering.

Proverna måste analyseras inom 24 timmar efter provtagning.

TECKEN PÅ FÖRSÄMRING

Varje förändring av det fysiska utseendet hos reagensen kan vara ett tecken på försämring och reagenset ska i sådana fall inte användas.

När det gäller förpackningsförsämring eller om erhållna data visar vissa prestandaförändringar, kontakta din lokala distributör eller använd följande e-postadress:

INNEHÅLL

Natriumazidkonserveringsmedel kan bilda explosiva föreningar i avloppsrör av metall. Se NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76) [NIOSH-bulletin: Explosiv azidrisk (1976-08-16)].

För att undvika risken för ansamling av azidföreningar ska avloppsrören spolas igenom med vatten efter att utspädda reagenser hålls ut. Kassering av natriumazid måste ske i enlighet med tillämpliga lokala regler.

NÖDVÄNDIGA MATERIAL SOM INTE INGÅR I SATSEN:

- Blodprovror och material nödvändigt för provtagning.
- Automatiska pipetter med engångspetsar för 20, 100 och 500 µL.
- Provrör i plast.
- Erythrocytlyseringsreagens med tvättsteg efter lysering. Exempelvis: VersaLyse (Ref. A09777).
- Leukocyt fixeringsreagens. Till exempel: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Isotypisk kontroll FITC IOTest reagens: (Ref. A07795.).
- Buffert (PBS: 0.01 M natriumfosfat; 0.145 M natriumklorid; pH 7.2).
- Centrifug.
- Automatisk blandare (Vortex typ).
- Flödescytometer.

PROCEDUR med VERSALYSE-REAGENS

OBSERVERA: Följande procedur gäller för standard applikationer. Prov och/eller VersaLyse volymer för speciella Beckman Coulter applikationer kan vara olika. Om så är fallet, följ instruktionerna på applikationens produktblad.

För varje prov som analyseras behövs, förutom röret med prov, ett kontrollrör där cellerna är blandade med isotypisk kontroll (Ref. A07795.).

1. Lägg till 20 mikroliter av specifik IOTest-konjugerad antikropp till varje provrör, och 20 mikroliter av isotypisk kontroll till varje kontrollrör.
2. Tillsätt 100 µL prov till båda rören. Vortexa rören försiktigt.
3. Inkubera i rumstemperatur (18–25 °C) i 15 till 20 minuter i skydd mot ljus. Utför därefter vid behov lyseringen genom att följa anvisningarna för det använda lyseringsreagenset.
4. Utför därefter vid behov lyseringen genom att följa anvisningarna för det använda lyseringsreagenset. Om du till exempel vill använda VersaLyse (Ref. A09777), läs du produktbladet och följ lämpligen beskrivningen under rubriken "med samtidig fixering", som innebär att man tillsätter 1 mL av "Fix-and-Lyse"-lösningen, som bereds strax före användning. Vortexa genast i 1 sekund och inkubera därefter i rumstemperatur i 10 minuter i skydd mot ljus. Om provet inte innehåller erythrocyter tillsätt 2 mL PBS.
5. Centrifugera i 5 minuter vid 150 x g i rumstemperatur.
6. Avlägsna supernatanten genom aspiration.
7. Resuspendera cellpelleten med 3 mL PBS.
8. Upprepa steg 5.
9. Avlägsna supernatanten genom aspiration och resuspendera cellpelleten med:

0,5 mL eller 1 mL av PBS plus 0,1 % formaldehyd om preparaten är avsedda att förvaras mindre än 24 timmar. (En 0,1 % formaldehyd-PBS kan erhållas genom spädning av 12,5 µL av IOTest 3-fixeringslösning (REF A07800) i dess 10X-koncentration i 1 mL PBS).

0,5 mL eller 1 mL PBS utan formaldehyd, om blandningarna skall analyseras inom 2 timmar.

OBS: Preparationerna ska alltid förvaras mellan 2 och 8 °C och skyddade för ljus.

FÖRVÄNTAT VÄRDE

Varje laboratorium måste kompilera en referensvärdestabell baserad på en grupp friska donatorer från den lokala populationen. Hänsyn måste tas till såväl ålder, kön och etnisk tillhörighet som andra potentiella regionala skillnader.

På våra laboratorier behandlades helblod från 10 friska vuxna. Erhållna resultat för antalet positiva händelser av intresse visas i tabellen nedan :

Lyfocyter	Antal	Medel (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monocyter	Antal	Medel (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulocyter	Antal	Medel (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

PRESTANDA

Data för prestanda erhålls med hjälp av ovan beskrivna metod på 24 timmar gamla blodprover som tagits i förväg i sterila rör med EDTA-salt som koagulationshämmare. Analysen utförs inom 2 timmar efter immunfärgning.

SPECIFICITET

CD71-molekylen (känd som transferrinreceptor eller T9-antigen) är ett homodimert transmembrant glykoprotein på 190 kDa (3). CD71 är involverad i järnupptaget genom att det binder transferrin (4). Det uttrycks av retikulocyter, erytroida prekursorer och kapillärendotelceller i hjärnan (4,5). Alla andra kända celltyper uttrycker CD71 endast när de börjar proliferera (4).

Att den monoklonala antikroppen YDJ1.2.2 binder till CD71 fastställdes vid 5th HLDA Workshop (Human Leucocyte Differentiation Antigens) som hölls i Boston, USA år 1993 (WS-kod: A006, Section: AA6) (3).

INTRA-LABORATORIE REPRODUCERBARHET

På samma dag och med användande av samma cytometer utfördes 12 mätningar av procent positiva mål. Erhållna resultat är summerade i följande tabell:

Positivt mål	Antal	Medel (%)	SD	CV (%)
Lymfocyter CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linearitet

För att testa linjäriteten vid infärgning med detta reagens blandades en positiv cellinje ((JURKAT)) och en negativ cellinje ((FRN3,4,14)) i olika proportioner, med det totala antalet celler konstant, så att förhållandet positiv / negativ cellinje i blandningen varierade från 0 till 100 %.

Aliquoter infärgades enligt ovanstående procedur och linjär regression mellan de förväntade värden och de erhållna värdena beräknades.

Specificitet	Linear regression	Linjäritet (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

BEGRÄNSNINGAR

- Flödescytometri kan ge falska resultat om cytometern inte har ställts in perfekt, om fluorescensläckor inte har kompenserats för korrekt och om regionerna inte har placerats noggrant.
- Det är bäst att använda en lyseringsmetod med tvätt eftersom detta reagens inte är optimerat för lyseringsmetoder av typen "no wash".
- Riktiga och reproducerbara resultat erhålls så länge som de använda procedurerna överensstämmer med det tekniska produktbladet och är förenliga med god laboratoriesed.
- Den konjugerade antikroppen i reagentet är kalibrerad till att ge optimalt förhållande mellan specifik och icke-specifik signal. Det är därför viktigt att upprätthålla ett korrekt volymförhållande mellan reagens och prov vid varje analys.
- I fallet med en leukocytos, spädd blodet i PBS för att erhålla ett värde på ungefär 5×10^9 leukocyter/L (6).
- Vid vissa sjukdomstillstånd, t.ex. svårartad njursvikt eller hemoglobinopati, kan lysering av röda blodkroppar vara långsam, ofullständig eller till och med omöjlig. I detta fall är det rekommenderat att isolera mononukleära celler med användning av en densitetsgradient (till exempel Ficoll) innan färgningen (7).

Se Appendix för exempel och referenser.

VARUMÄRKEN

Beckman Coulter, den stiliserade logotypen och Beckman Coulters produkt- och tjänstemärken som nämns här är varumärken eller registrerade varumärken som tillhör Beckman Coulter, Inc. i USA eller andra länder.

Teckenförklaring för symboler

Ordlista för symboler finns på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Χαρακτηριστικά
Ειδικότητα	CD71
Κλώνος	YDJ1.2.2
Υβρίδωμα	X63 x balb/c
Ανοσογόνο	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Ανοσοσφαιρίνη	IgG1
Είδος	Ποντικός
Καθαρισμός	Χρωματογραφία συγγένειας
Φθοριόχρωμα	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Γραμμομοριακή	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ διέγερσης	488 nm
Κορυφή εκπομπής	525 nm
Ρυθμιστικό Διάλυμα	PBS pH 7,2 εμπλουτισμένο με 2 mg / mL BSA και 0,1% NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL,
20μL/δοκιμασία

Για *In Vitro* διαγνωστική χρήση

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αυτό το αντίσωμα συζευγμένο με ένα φθοριόχρωμα επιτρέπει την ταυτοποίηση και την καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν το αντιγόνο CD71 και που είναι παρόντες σε ανθρώπινα βιολογικά δείγματα μέσω κυτταρομετρίας ροής.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην ικανότητα των εξειδικευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων να προσκολλώνται στα λευκοκύτταρα μέσω των αντιγονικών καθοριστών που αυτά εκφράζουν.

Η εξειδικευμένη αυτή σήμανση των λευκο-κυττάρων πραγματοποιείται μέσω της επώασης του δείγματος με το αντιδραστήριο IOTest. Εν συνέχεια, τα ερυθροκύτταρα εξαλείφονται μέσω λύσης και τα λευκοκύτταρα, που παραμένουν ανεπηρέαστα από αυτό το βήμα, αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Ο κυτταρομετρητής ροής μετράει τη διάχυση του φωτός όπως και τον φθορισμό των κυττάρων. Επιτρέπει τον περιορισμό του πληθυσμού στόχου στο εσωτερικό ενός ηλεκτρονικού παραθύρου, που ορίζεται σε ένα ιστόγραμμα που συσχετίζει την πλάγια σκέδαση ("Side Scatter" ή SS) με την πρόσθια σκέδαση ("Forward Scatter" ή FS). Άλλα ιστογράμματα που συνδυάζουν δύο από τις διαθέσιμες διαφορετικές παραμέτρους του κυτταρομετρητή μπορούν εξίσου να χρησιμοποιηθούν υποστηρικτικά κατά το στάδιο του ηλεκτρονικού περιορισμού μέσω της εφαρμογής που επιλέγει ο χρήστης.

Ο φθορισμός των περιορισμένων κυττάρων αναλύεται ώστε να γίνει διάκριση μεταξύ των θετικά σημασμένων συμβάντων από τα μη σημασμένα συμβάντα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως το ποσοστό των θετικών συμβάντων σε σχέση με το σύνολο των αποκτηθέντων συμβάντων κατά τον ηλεκτρονικό περιορισμό.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

Ο αποδέκτης τρανσφερίνης (CD71) εκφράζεται στα πολλαπλασιαστικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασματικών κύτταρων, ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και αιμοποιητικών κυττάρων προδρόμων. Η έκφραση του CD71 έχει χρησιμοποιηθεί για την ανοσοφαινοτυπική συνάθροιση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (1) καθώς και για την διαφοροποίηση των εμβρυακών από τα μητρικά κύτταρα (2).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Συγκέντρωση: Δείτε το συγκεκριμένο πιστοποιητικό ανάλυσης της κάθε παρτίδας στο www.beckmancoulter.com.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Μη χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης.
2. Μην το ψύχετε.
3. Αφήστε το αντιδραστήριο να επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18 – 25 °C) πριν από τη χρήση.
4. Διατηρήστε στο ελάχιστο τον χρόνο έκθεσης στο φως.
5. Αποφύγετε τη μόλυνση των αντιδραστηρίων από μικρόβια ώστε να αποφύγετε την εμφάνιση λανθασμένων αποτελεσμάτων.
6. Χειριστείτε τα διαλύματα αντισωμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου (NaN₃) με προσοχή. Μην εισπνέετε και αποφεύγετε κάθε επαφή με το δέρμα, τους βλεννογόνους και τα μάτια.
Ακόμη, σε όξινο περιβάλλον, το αζίδιο του νατρίου μπορεί να σχηματίσει υδροζωικό οξύ που είναι πιθανά επικίνδυνο. Εάν είναι απαραίτητη η απόχυση του αντιδραστηρίου, συστήνεται η αραίωσή του σε μεγάλο όγκο νερού πριν από τη ρίψη του στους αγωγούς υδάτων, ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση NaN₃ στους μεταλλικούς αγωγούς και να προληφθεί ο κίνδυνος έκρηξης.
7. Κάθε δείγμα αίματος θα πρέπει να θεωρείται πιθανά μολυσματικό και κάθε μέτρο προφύλαξης θα πρέπει να τηρείται κατά τη χρήση του (ειδικότερα: η χρήση γαντιών, στολής και προστατευτικών γυαλιών).
8. Αποφύγετε κάθε επαφή της πιπέτας με το στόμα καθώς και κάθε επαφή των δειγμάτων με το δέρμα, τους βλεννογόνους και τα μάτια.
9. Τα φιαλίδια αίματος και τα χρησιμοποιημένα υλικά μιας χρήσης θα πρέπει να απορρίπτονται σε κατάλληλα δοχεία που προορίζονται για αποτέφρωση.
10. Τα αντιδραστήρια και τα απόβλητα πρέπει να εξαλείφονται σύμφωνα με τις τοπικές απαιτήσεις.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΠΕΣ

Δεν ταξινομείται ως επικίνδυνο

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Οι υγρές συζευγμένες ουσίες διατηρούνται σε θερμοκρασίες μεταξύ 2 και 8 °C προστατευμένες από το φως, πριν και μετά από το άνοιγμα του φιαλιδίου.

Σταθερότητα κλειστού φιαλιδίου: βλέπε ημερομηνία λήξης του αντιδραστηρίου όπως αυτή αναγράφεται στο φιαλίδιο.

Σταθερότητα ανοιγμένου φιαλιδίου: το αντιδραστήριο είναι σταθερό για 180 ημέρες.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα δείγματα φλεβικού αίματος θα πρέπει να διατηρούνται σε αποστειρωμένα φιαλίδια που περιέχουν EDTA ως αντιπηκτικό

Τα δείγματα διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18 – 25 °C) και χωρίς ανακίνηση. Πριν από τη δοκιμαστική λήψη συνίσταται η ομογενοποίηση του δείγματος μέσω ήπιας ανακίνησης.

Η ανάλυση των δειγμάτων πρέπει να λαμβάνει χώρα εντός 24 ωρών από τη λήψη τους.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ

Η οποιαδήποτε αλλαγή στη φυσική εμφάνιση των αντιδραστηρίων μπορεί να υποδεικνύει αλλοίωση και το αντιδραστήριο δεν πρέπει να χρησιμοποιείται.

Σε περίπτωση αλλοίωσης της συσκευασίας ή εάν τα δεδομένα που λήφθηκαν παρουσιάζουν κάποια αλλοίωση της απόδοσης, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα ή χρησιμοποιήστε την ακόλουθη διεύθυνση e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Το συνηρητικό αζίδιο νατρίου ενδέχεται να σχηματίσει εκρηκτικές ενώσεις σε μεταλλικούς αγωγούς αποχέτευσης. Βλ. NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (16/08/76) [Δελτίο Εθνικού Ινστιτούτου Επαγγελματικής Ασφάλειας και Υγείας των ΗΠΑ: Κίνδυνος από εκρηκτικά αζίδια (16/08/1976)].

Για να αποφύγετε την ενδεχόμενη συσσώρευση ενώσεων αζιδίου, να εκπλένετε τους σωλήνες αποβλήτων με νερό μετά την απόρριψη μη αραιωμένου αντιδραστηρίου. Η απόρριψη του αζιδίου του νατρίου πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους αντίστοιχους τοπικούς κανονισμούς.

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ:

- Σωλήνες για τη λήψη δειγμάτων και υλικά που απαιτούνται για τις δειγματοληψίες.
- Αυτόματες πιπέτες με αναλώσιμα ρύγχη για 20, 100 και 500 μL.
- Πλαστικοί σωλήνες αιμόλυσης.
- Αντιδραστήριο λύσης των ερυθροκυττάρων με στάδιο πλύσης μετά τη λύση. Για παράδειγμα: VersaLyse(Κωδ. A09777).
- Αντιδραστήριο στερεότητας των λευκοκυττάρων. Για παράδειγμα: Στερεωτικό Διάλυμα IOTest 3 (Κωδ. A07800).
- Ισοτυπικός Έλεγχος FITC : αντιδραστήριο IOTest (Κωδ. A07795.).
- Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS: 0,01 M φωσφορικό νάτριο, 0,145 M χλωριούχο νάτριο, pH 7,2).
- Συσκευή φυγοκέντρησης.
- Αυτόματος αναδευτήρας (τύπου Vortex).
- Κυτταρομετρητής ροής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ VERSALYSE

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η παραπάνω διαδικασία ισχύει για τις τυποποιημένες εφαρμογές. Οι όγκοι των δειγμάτων ή/και του VersaLyse για ορισμένες εφαρμογές Beckman Coulter μπορούν να διαφέρουν. Σε μια τέτοια περίπτωση, ακολουθείστε τις οδηγίες του τεχνικού φυλλαδίου της εφαρμογής.

Για κάθε δείγμα προς ανάλυση, προβλέψτε εκτός του δοκιμαστικού σωλήνα, έναν σωλήνα ελέγχου μέσα στον οποίο τα κύτταρα θα βρίσκονται υπό την παρουσία του ισοτυπικού ελέγχου (Κωδ. A07795.).

1. Προσθέστε 20 μL ειδικού συζευγμένου αντισώματος IOTest σε κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο και 20 μL του ισοτυπικού μάρτυρα σε κάθε σωληνάριο μάρτυρα.
2. Προσθέστε 100 μL του προς εξέταση δείγματος στους 2 σωλήνες. Ανακινήστε ελαφρά με Vortex.
3. Επωάστε για 15 με 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18 – 25 °C) και μακριά από εστίες φωτός.
4. Προχωρήστε, εάν είναι απαραίτητο, στη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ακολουθώντας τις οδηγίες του αντιδραστηρίου λύσης που χρησιμοποιείτε. Για παράδειγμα, εάν επιθυμείτε να χρησιμοποιήσετε το VersaLyse (Κωδ. A09777), αναφερθείτε στις τεχνικές οδηγίες και ακολουθείστε κατά προτίμηση την διαδικασία «με συνακόλουθη στερεότητα» που συνίσταται στο να προσθέσετε 1 mL του μείγματος "Fix-and-Lyse" που κατασκευάζεται αυτοσχέδιως. Ανακινήστε αμέσως με Vortex ένα δευτερόλεπτο και επωάστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μακριά από εστίες φωτός. Αν το δείγμα δεν περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια, προσθέστε 2 mL PBS.
5. Φυγοκεντρίστε στα 150 x g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Απαλλαχθείτε από το υπερκείμενο μέσω αναρρόφησης.
7. Ενωρήστε ξανά το κυτταρικό ίζημα σε 3 mL PBS.
8. Επαναλάβετε το βήμα 5.
9. Απαλλαχθείτε από το υπερκείμενο μέσω αναρρόφησης και εναιωρήστε ξανά το κυτταρικό ίζημα σε:

0,5 mL ή 1 mL PBS συν 0,1% φορμαλδεΐδη, εάν τα παρασκευάσματα πρόκειται να φυλαχθούν για λιγότερο από 24 ώρες. (Μπορείτε να παρασκευάσετε διάλυμα 0,1% φορμαλδεΐδης/PBS αραιώνοντας 12,5 μL του μονιμοποιητικού διαλύματος IOTest 3 (REF A07800) 10πλάσιας συγκέντρωσης σε 1 mL PBS).

0,5 mL ή 1 mL PBS χωρίς φορμαλδεΐδη, αν τα παρασκευάσματα πρόκειται να αναλυθούν μέσα στις επόμενες 2 ώρες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Διατηρείτε τα παρασκευάσματα μεταξύ 2 και 8 °C και μακριά από εστίες φωτός.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Κάθε εργαστήριο οφείλει να καθιερώσει μια λίστα με τιμές αναφοράς βασισμένες σε μια ομάδα από υγιείς δότες που ανήκουν στον ντόπιο πληθυσμό. Για τη λίστα αυτή πρέπει να ληφθούν υπόψη η ηλικία, το φύλο, η εθνική καταγωγή, καθώς και η οποιαδήποτε άλλη πιθανή τοπική διαφορά.

Στα εργαστήριά μας εξετάστηκε το ολικό αίμα 10 υγιών ενηλίκων, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν για την καταμέτρηση των θετικών συμβάντων με αυτό το αντιδραστήριο ομαδοποιήθηκαν στον παρακάτω πίνακα :

Λεμφοκύτταρα	Αριθμός	MO (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Μονοκύτταρα	Αριθμός	MO (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Κοκκιοκύτταρα	Αριθμός	MO (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

ΑΠΟΔΟΣΗ

Χρησιμοποιώντας την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω γίνεται η απόκτηση των δεδομένων της επίδοσης των 24-ώρων δειγμάτων του αίματος, που συλλέχθηκαν προηγουμένως σε αποστειρωμένα φιαλίδια που περιείχαν άλας EDTA ως αντιπηκτικό. Η ανάλυση εκτελείται μέσα σε 2 ώρες μετά από την ανοσοχρώση.

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Το μόριο CD71, γνωστό ως αποδέκτης τρυσφαιρίνης ή αντιγόνο T9, είναι μία ομοδιμερής διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 190 kDa (3). Το CD71 εμπλέκεται στην λήψη σιδήρου από την τρυσφαιρίνη δέσμευσης (4). Εκφράζεται από δικτυοκύτταρα, ερυθροειδή πρόδρομους και τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα στον εγκέφαλο (4,5). Όλοι οι άλλοι γνωστοί τύποι κυττάρων εκφράζουν το CD71 μόνο όταν εισέρχεται σε πολλαπλασιασμό (4).

Το YDJ1.2.2 μονοκλωνικό αντίσωμα ανατέθηκε στο CD71 κατά το 5ο HLDA Workshop για τα Αντιγόνα Διαφοροποίησης των Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων που έλαβε χώρα στη Βοστώνη, στις Η.Π.Α. το 1993 (Κωδικός WS: A006, Ενότητα AA6) (3).

ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Την ίδια ημέρα και μέσω του ίδιου κυτταρομετρητή ροής πραγματοποιήθηκαν 12 προσδιορισμοί του ποσοστού σήμανσης ενός θετικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν ομαδοποιήθηκαν στον παρακάτω πίνακα:

Θετικός στόχος	Αριθμός	MO (%)	SD	CV (%)
Λεμφοκύτταρα CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Γραμμικότητα

Προκειμένου να ελεγχθεί η γραμμικότητα σήμανσης αυτού του αντιδραστηρίου, μία θετική κυτταρική σειρά ((JURKAT)) και μία αρνητική κυτταρική σειρά ((FRN3,4,14)) αναμείχθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες και με σταθερή τελική κυτταρική ποσότητα, έτσι ώστε η αναλογία της θετικής σειράς/αρνητικής σειράς του μείγματος να κυμαίνεται από 0 έως 100%.

Τα τμήματα σημάνθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και η γραμμική παλινδρόμηση των αναμενόμενων τιμών έναντι των τιμών που παρατηρήθηκαν υπολογίστηκε.

Ειδικότητα	Γραμμική Παλινδρόμηση	Γραμμικότητα (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να παραγάγει ψευδή αποτελέσματα εάν το κυτταρόμετρο δεν έχει ευθυγραμμιστεί τέλεια, εάν δεν έχουν αντισταθμιστεί σωστά οι διαρροές φθορισμού και εάν οι περιοχές δεν έχουν τοποθετηθεί προσεκτικά.
2. Χρησιμοποιείτε κατά προτίμηση μια τεχνική λύσης των ερυθροκυττάρων με πλύση καθώς η λειτουργία αυτού του αντιδραστηρίου δεν είναι η βέλτιστη για τις τεχνικές λύσης "χωρίς πλύση".
3. Ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα εξάγονται στο μέτρο που οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνες με τις τεχνικές οδηγίες και συμβατές με τις βέλτιστες εργαστηριακές πρακτικές.
4. Το συζευγμένο αντίσωμα αυτού του αντιδραστηρίου είναι βαθμονομημένο ώστε να προσφέρει την καλύτερη αναλογία ειδικής σήμανσης / μη ειδικής σήμανσης. Για αυτό το λόγο, είναι σημαντικό να τηρείτε την αναλογία όγκου αντιδραστηρίου / όγκου δείγματος σε κάθε δοκιμασία.
5. Στην περίπτωση υπερλευκοκυττάρωσης, αραιώστε το αίμα σε PBS για να λάβετε μια τιμή 5×10^9 λευκοκύτταρα/L κατά προσέγγιση (6).
6. Σε ορισμένες ασθένειες, όπως σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια ή αιμοσφαιρινοπάθειες, η λύση των ερυθρών κυττάρων ενδεχομένως να είναι αργή, ατελής ή ακόμη να μην είναι δυνατή. Σε αυτή την περίπτωση, συνιστάται να απομονώσετε μονοπύρνα κύτταρα με τη χρήση μέσου διαχωρισμού που βασίζεται στη μεταβολή πυκνότητας (Ficoll, για παράδειγμα) πριν από τη χρώση (20).

Βλέπε το παράρτημα (APPENDIX) για παραδείγματα (EXAMPLES) και τη βιβλιογραφία (REFERENCES).

ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ

Η επωνυμία Beckman Coulter, το τυποποιημένο λογότυπο και τα σήματα προϊόντων και υπηρεσιών της Beckman Coulter που αναφέρονται στο παρόν είναι εμπορικά σήματα ή σήματα κατατεθέντα της Beckman Coulter, Inc. στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε άλλες χώρες.

Υπόμνημα συμβόλων

Το γλωσσάριο συμβόλων είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση beckman.com/techdocs (αριθμός εγγράφου B60062)

	Specifikációk
Specifititás	CD71
Klón	YDJ1.2.2
Hibridóma	X63 x balb/c
Immunogén	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Immunglobulin	IgG1
Faj	Egér
Tisztítás	Affinitás kromatográfia
Fluorokróm	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Molarány	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ excitation	488 nm
Emissziós csúcs	525 nm
Puffer	PBS pH 7,2 plusz 2 mg / mL BSA és 0,1% NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 μ L / teszt

In vitro diagnosztikai használatra

RENDELTESSZERŰ HASZNÁLAT

Ez a fluorokrómmal konjugált antitest lehetővé teszi a CD71 antigént kifejező sejtpopulációk azonosítását és mennyiségi meghatározását humán biológiai mintákban, áramlási citométer segítségével.

MŰKÖDÉSI ELV

A vizsgálat alapjában a leukociták által expresszált antigén-determinánsokhoz kapcsolódni képes specifikus monoklonális antitestek szolgálnak.

A minták IOTest reagenssel történő inkubációja során a mintában a leukociták specifikusan festődnek. Ezután lízis következik, mely eltávolítja a vörösvértesteket, végül a leukocitákat, melyekre ez a lépés nem hat, áramlási citometriával analizálják.

Az áramlási citometria a sejtek fényszórását és fluoreszcenciáját vizsgálja. Az áramlási citometria segítségével elhatárolható a vizsgálni kívánt sejtpopuláció az ortogonális fényszórást (Side Scatter vagy SS) és a kis szögű fényszórást (Forward Scatter vagy FS) összevető hisztogrammon meghatározott elektronikus ablakban. Egyéb paraméter-párokat összevető hisztogramok is rendelkezésre állnak a kapuzási (gating) lépés során, a választott alkalmazás függvényében.

A kijelölt sejtek fluoreszcenciája mérhető, így a pozitívan festődött események megkülönböztethetők a nem festődöttektől. A módszer a pozitív eseményeknek a kapuzás során analizált összes eseményhez viszonyított arányaként adja meg az eredményeket.

PÉLDÁK KLINIKAI ALKALMAZÁSRA

A transferrin receptor (CD71) az osztódó sejteken fejeződik ki, beleértve a neoplasztikus sejteket, az aktivált limfocitákat, és a haematopoetikus prekursor sejteket. A CD71 kifejeződését mielodiszpláziaszindrómák immunfenotipizáló csoportosítására (1), valamint az anya és a magzat sejteinek megkülönböztetésére (2) alkalmazzák.

REAGENSEK

Koncentráció: Lásd a tételspecifikus Analízistanúsítványt a www.beckmancoulter.com weboldalon.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

- Ne használja fel a reagenst a lejárat dátumon túl.
- Fagyasztani tilos.
- Használat előtt engedje fel szobahőmérsékletre (18 – 25 °C).
- Amennyire lehet, óvja a reagenst a fénytől.
- Óvja a reagenst a mikrobiális fertőzéstől. A mikrobiális fertőzés téves eredményekhez vezethet.
- Óvatosan kezelje a nátrium-azidot (NaN₃) tartalmazó antitest-oldatokat. Vigyázzon, hogy ne jusson a szervezetébe, és ne érintkezzen bőrrel, nyálkahártyával és a szemmel.
Savas közegben a nátrium-azid továbbá potenciálisan veszélyes hidrazonsavat képezhet. Ha a reagenst ki kell önteni, javasoljuk, hogy nagymennyiségű vízzel hígítsa fel, mielőtt a lefolyóba önti. Ezzel elkerülhető a nátrium-azidnak a fém csövekben történő, robbanásveszéllyel járó felhalmozódása.
- Minden vérmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni, és ennek megfelelő elővigyázatossággal kell kezelni (különös tekintettel a védőkesztyű-, -köpeny és-szemüveg viselésére).
- Soha ne pipetázzon szájjal, és kerülje a bőr és nyálkahártya mintákkal való érintkezését.
- A vérminták és a kezelésük során használt eldobható anyagokat elégetésre szánt gyűjtőedényekben kell gyűjteni.
- A reagenst és a hulladékot a helyi szabályozásnak megfelelően kell elpusztítani.

GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

Nincs veszélyes anyagként besorolva.

SDS	A biztonsági adatlap elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs
------------	---

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A folyékony konjugátumokat 2 és 8 °C között, fénytől védve kell tárolni az üvegcsé felnyitása előtt és után is.

Stabilitás lezárt üvegcsében: lásd az üvegcsén látható lejárati időt.

Felnyitott ampulla stabilitása: a reagens 180 napon át stabil.

MINTÁK

A vénás vérmintákat és csontvelő-mintákat steril, antikoagulánsként EDTA sóját tartalmazó csövekbe kell gyűjteni.

A mintákat szobahőmérsékleten kell tárolni (18 – 25 °C) és nem szabad összerázni. A mintákat a tesztminta vétele előtt kíméletes keveréssel kell homogenizálni.

A mintákat a vénás vérvételt követően 24 órán belül analizálni kell.

MEGROMLÁSRA UTALÓ JELEK

A reagensek fizikai megjelenésének mindennemű megváltozása a reagens minőségének romlását jelezheti; ilyen esetben a reagenst nem szabad felhasználni.

Ha a csomagolás sérült, vagy ha a visszakapott adatok a teljesítmény változását mutatják, kérjük, vegye fel a kapcsolatot helyi terjesztőjével, vagy írjon a következő email címre: immuno-techsup@beckmancoulter.com

TARTALOM

A nátrium-azid tartósítószer robbanékony vegyületeket képezhet a fémek lefolyóvezetékekben. Lásd a NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76) (NIOSH közlemény: A robbanékony azidokkal kapcsolatos veszélyek (1976. 08. 16.)) közleményt.

Az azidvegyületek esetleges felhalmozódásának elkerülése érdekében a hígítatlan reagens szennyvízlefolyóba történő kiöntése után a szennyvízvezetékkel vizet át kell öblíteni. A nátrium-azid ártalmatlanítását a vonatkozó helyi előírásoknak megfelelően kell végezni.

SZÜKSÉGES, DE A KÉSZLETTEL NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK:

- Mintavédo csövek, és a mintavételhez szükséges anyagok.
- Eldobható végű automatikus pipetták a 20 érdekében, 100 és 500 µL.
- Műanyag hemolízis csövek.
- Vörösvértest lízis reagens, a lízist követő mosási lépéssel. Példa : VersaLyse (Ref. A09777).
- Leukocita fixáló reagens. Példa : IOTest 3 Fixative Solution fixáló oldat (Ref. A07800).
- Izotipikus kontrol FITC : IOTest reagens (Ref. A07795.).
- Puffer (PBS: 0,01 M nátrium-foszfát; 0,145 M nátrium-klorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automata keverő (vortex típusú).
- Áramlási citométer.

ELJÁRÁS VERSALYSE REAGENS ESETÉN

Megjegyzés: Az alábbi műveletek az alap alkalmazások esetén érvényesek. A minta és/vagy a VersaLyse térfogatok bizonyos Beckman Coulter alkalmazások esetén különbözőek lehetnek. Ilyen esetben kövesse az alkalmazás technikai leírásában található útmutatót.

Minden analizálandó mintához a teszt csövön felül egy kontroll cső is szükséges amiben a sejteket a választott specifikus festésnek megfelelő izotipikus kontrollal vannak összekeverve (Ref. A07795.).

1. Adjon 20 minden teszt csőhöz µL specifikus IOTest konjugált antitestet, majd 20 µL izotípus kontrollt minden egyes kontroll csőhöz.
2. Adjon 100 µL teszt mintát a mindkét csőhöz. Óvatosan vortexelje a kémcsöveket.
3. Inkubálja szobahőmérsékleten (18 – 25 °C), fénytől védve, 15 – 20 percig.
4. Ha szükséges, végezze el a vörösvértestek lízisét a lízis reagenshez kapott ajánlások alapján. Például: ha a VersaLyse (Ref. A09777) reagenst kívánja használni, lehetőség szerint kövesse a kísérő fixálós eljárás alkalmazó útmutatót, amelyben 1 mL "Fix-and-Lyse" frissen készített elegyet kell a mintához adni. Azonnal vortexelje egy másodpercig, és inkubálja szobahőmérsékleten, fénytől védve, 10 percig. Ha a minta nem tartalmaz vörösvértesteket adjon hozzá 2 mL PBS-t.
5. Centrifugálja a kémcsöveket 5 percig 150 x g sebességen, szobahőmérsékleten.
6. Szívja le a felülúszót.
7. Oldja fel a sejtüledéket 3 mL PBS-ben.
8. Ismétlje meg az 5-ös lépést.
9. Távolítsa el a felülúszót és oldja fel a sejtüledéket a következő oldatokban:

0,1% formaldehidet tartalmazó 0,5 mL vagy 1 mL PBS, ha a készítményt legfeljebb 24 óráig fogják tárolni. (0,1% formaldehidet tartalmazó PBS készítéséhez hígítson 12,5 µL IOTest 3 fixáló oldatot (REF A07800) a 10-szeresére 1 mL PBS-ben).

0,5 mL vagy 1 mL formaldehid nélküli PBS-ben, amennyiben a minta analizését 2 órán belül elvégzik.

MEGJEGYZÉS: A készítményeket minden esetben 2 és 8 °C között, fénytől védve tárolja.

VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

Minden laboratóriumnak meg kell határoznia saját referenciaértékeit, a helyi populációból származó egészséges donorok eredményei alapján. Ennek során a kort, nemet és etnikai csoportot, valamint bármely egyéb, esetlegesen előforduló helyi különbséget figyelembe kell venni.

10 egészséges felnőtt teljes vérmintáját kezeltük laboratóriumunkban a fent leírt reagenssel. A vizsgált pozitív események megszámlálásából kapott eredményeket az alábbi táblázatok tartalmazzák.

Limfociták	Szám	Átlag (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monociták	Szám	Átlag (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulociták	Szám	Átlag (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

TELJESÍTMÉNY

A mérés működését jellemző adatokat a fent leírt módszerrel, 24 órás, előzőleg EDTA véralvadásgátlót tartalmazó steril csőbe gyűjtött vérmintán végzett mérések szolgáltatották. Az analízist 2 órával az immunfestés után kell elvégezni.

SPECIFICITÁS

A transferrin receptor vagy T9 antigén néven ismert CD71 molekula egy 190 kDa tömegű homodimer transzmembrán glikoprotein (3). A CD71 a transferrin megkötésével játszik szerepet a vasfelvételben (4). A retikulocitákon, az eritroid prekurzorokon, és az agyi kapilláris endotélsejteken fejeződik ki (4,5). A CD71 az összes többi ismert sejttípuson csak osztódásuk kezdetén fejeződik ki (4).

Az YDJ.1.2.2. monoklonális antitestet az ötödik HLDA (Human Leucocyte Differentiation Antigens) Workshop (1993 Boston, USA, WS-kód: A006, AA6 szekció) alkalmával rendelték a CD71 kimutatására (3).

LABORATÓRIUMOK KÖZÖTTI ÁTJÁRTHATÓSÁG

Azonos napon, azonos citométert használva, 12 , a pozitív sejteket tartalmazó minták festődésének arányát mérő vizsgálatot végeztünk . A kapott eredményeket az alábbi táblázat foglalja össze:

Pozitív cél	Szám	Átlag (%)	SD	CV (%)
Limfociták CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linearitás

A reagens festődésének linearitását az alábbiak szerint ellenőrizték. Egy pozitív sejtvonal ((JURKAT)) és egy negatív sejtvonal ((FRN3,4,14)) sejteit különböző arányokban keverték össze (a teljes sejtszámot állandónak tartva), oly módon, hogy a keverékben a pozitív/negatív sejtek aránya 0 és 100% között változott.

A keverékekből vett alikvotoknak a fenti eljárás szerinti festését követően a várt és a megfigyelt értékek közötti lineáris regressziót számították ki.

Specificitás	Lineáris Regresszió	Linearitás (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

KORLÁTOZÁSOK

- Az áramlási citometria téves eredményeket szolgáltathat, ha a citométer beállítása nem tökéletes, ha a fluoreszcencia kompenzáció helytelen, vagy ha a régiók pozicionálását nem elég alaposan és körültekintően végezték.
- Javasolt mosási lépést is tartalmazó vörösvértest lízisz módszer alkalmazása, mivel ezt a reagenst nem optimalizáltuk "mosás nélküli" lízisz módszerekhez.
- Ha az alkalmazott eljárások összhangban vannak a műszaki tájékoztatóban foglaltakkal és a laboratóriumi munkavégzés általános szabályaival, a módszer pontos és reprodukálható eredményeket szolgáltató.
- A reagensben található konjugált antitestek a legjobb specifikus jel / nem specifikus jel arányra vannak optimalizálva. Ezért fontos, hogy minden teszt során betartsa a javasolt reagens térfogat / minta térfogat arányt.
- Hyperleucocytosis esetén PBS-ben hígítsa fel a vért addig, amíg el nem éri a körülbelül 5×10^9 leukocita/L értéket (6).
- Bizonyos betegségi állapotok, például súlyos veseelégtelenség vagy hemoglobinopátiák esetén a vörös sejtek lízise lassúvá, tökéletlenné vagy lehetetlenné válhat. Ebben az esetben javasolt egymagú sejtek elkülönítése egy sűrűségi gradiens segítségével (például Ficoll) még a festés előtt (7).

Példákat (Examples) és referenciákat (References) a függelékben (Appendix) talál.

VÉDJEGYEK

A Beckman Coulter, a stílizált logó, valamint az itt említett Beckman Coulter termék- és szolgáltatásjegyek a Beckman Coulter, Inc. védjegyei vagy bejegyzett védjegyei az Egyesült Államokban és más országokban.

Szimbólumok listája

A szimbólumok jegyzéke elérhető a következő weboldalon: beckman.com/techdocs (dokumentumszám: B60062)

	Specifikace
Specifita	CD71
Klon	YDJ1.2.2
Hybridom	X63 x balb/c
Imunogen	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Imunoglobulin	IgG1
Živočišný druh	Myš
Purifikace	Afinitní chromatografie
Fluorochrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Molární poměr	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ excitace	488 nm
Maximum emise	525 nm
Pufr	PBS pH 7,2 plus 2 mg / ml BSA a 0,1 % NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 ml, 20 μ l / test

Pro použití při diagnostice *in vitro*

URČENÉ POUŽITÍ

Tato protilátka konjugovaná s fluorochromem umožňuje metodou průtokové cytometrie identifikovat a určit počet buněk v populacích, které v lidských biologických vzorcích exprimují antigen CD71.

PRINCIP

Test je založen na schopnosti specifických monoklonálních protilátek vázat se na antigenní determinanty exprimované na leukocytech.

Specifické stanovení leukocytů je prováděno inkubováním vzorku s reagensí IOTest. Červené krvinky jsou poté odstraněny ze vzorku lýzou a leukocyty, které lýzou nejsou ovlivněny, jsou analyzovány průtokovým cytometrem.

Průtokový cytometr měří rozptýl světla a fluorescenci buněk. Podle těchto parametrů jsou buňky lokalizovány uvnitř elektronicky vytvořeného okna definovaného histogramem, který koreluje kolmý rozptýl světla ("Side Scatter", SS) a rozptýl světla v malém úhlu ("Forward Scatter", FS). Další histogramy, kombinující dva různé parametry dostupné na cytometru, je možno využít při elektronickém výběru populace buněk ("gatování") v závislosti na uživatelem zvolené aplikaci.

Na základě fluorescence vybraných buněk, které dávají pozitivní signál, jsou odlišeny označené částice od neoznačených. Výsledek je vyjádřen jako procentuální zastoupení pozitivních částic ve vztahu ke všem částicím vybraným při elektronickém "gatování".

PŘÍKLADY KLINICKÝCH APLIKACÍ

Transferinový receptor (CD71) je exprimován na proliferujících buňkách včetně neoplastických buněk, aktivovaných lymfocytů a hematopoetických prekursorových buněk. Expresí antigenu CD71 se používá při imunofenotypizační klasifikaci myelodysplastických syndromů (1) a také při odlišování buněk plodu od buněk matky (2).

REAGENCIE

Koncentrace: Viz osvědčení o analýze pro danou šarži na stránce www.beckmancoulter.com.

VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

- Nepoužívejte reagenty s prošlým datem expirace.
- Nezmrazovat.
- Před použitím ponechte vytemperovat na laboratorní teplotu (18 – 25 °C).
- Omezte působení světla na minimum.
- Vyvarujte se mikrobiální kontaminace reagenty, která může být příčinou chybných výsledků.
- Roztoky protilátek obsahují azid sodný (NaN₃), proto s nimi musí být zacházeno opatrně. Nepoužívejte vnitřně a vyvarujte se kontaktu reagenty s pokožkou, sliznicemi a očima.
V kyselém prostředí může z azidu sodného vzniknout potenciálně nebezpečná hydrazidová kyselina. Pokud je třeba reagenty zlikvidovat, doporučuje se naředit je před vylitím do odpadu velkým množstvím vody, aby se předešlo nahromadění azidu v kovovém potrubí a tím i riziku exploze.
- Všechny krevní vzorky musí být považovány za potenciálně infekční a při zacházení s nimi je třeba dodržovat zásady bezpečnosti práce (zejména používat osobní ochranné pomůcky: rukavice, plášť a brýle).
- Nikdy nepipetujte ústy a vyvarujte se kontaktu vzorků s pokožkou, sliznicemi a očima.
- Zkumavky s krví a použitý jednorázový materiál je třeba likvidovat spálením ve speciálních kontejnerech.
- Reagenty a odpad je třeba zlikvidovat v souladu s místními požadavky.

KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Není klasifikované jako nebezpečné

SDS	Bezpečnostní list je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs
------------	---

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Konjugované protilátky ve formě roztoku musí být uchovávány při 2 až 8 °C bez přístupu světla předtím i poté, co byla lahvička otevřena.

Stabilita obsahu dosud neotevřených lahviček: viz datum expirace uvedené na štítku lahvičky.

Stabilita otevřené lahvičky: reagensie je stabilní po dobu 180 dnů.

VZORKY

Vzorky žilní krve musí být odebrány do sterilních zkumavek obsahujících EDTA jako antikoagulační činidlo.

Vzorky by měly být uchovávány bez míchání při laboratorní teplotě (18 – 25 °C). Před odebráním vzorků z odběrové zkumavky do testových zkumavek je třeba vzorky jemně promíchat.

Vzorky musí být analyzovány do 24 hodin od odběru.

ZNÁMKY ZNEHODNOCENÍ

Jakákoli změna fyzického vzhledu reagensií může signalizovat znehodnocení. Reagensii v takovém případě nepoužívejte.

V případě poškození obalu nebo vykazují-li získaná data změnu účinnosti metody, kontaktujte svého místního distributora nebo použijte následující e-mailovou adresu:

OBSAH

Konzervační činidlo azid sodný může v kovovém odpadním vedení vytvářet výbušné sloučeniny. Viz NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Bulletin NIOSH: Nebezpečí výbušného azidu) (16. 8. 1976).

Po vypuštění nefeděné reagensie propláchněte odpadní potrubí vodou, aby se nehromadily azidové sloučeniny. Likvidace azidu sodného musí být prováděna podle příslušných místních předpisů.

MATERIÁLY POTŘEBNÉ, ALE NEDODANÉ SE SOUPRAVOU:

- Zkumavky k odběru vzorků a materiál potřebný pro odběr.
- Automatické pipety s jednorázovými špičkami na 20, 100 a 500 µl.
- Plastové hemolyzační zkumavky.
- Činidlo k lýze červených krvinek s promývacím krokem zařazeným po lýze, např. lyzační roztok VersaLyse (Ref. A09777).
- Činidlo pro fixaci leukocytů, např. fixační roztok IOTest 3 (Ref. A07800).
- Izotypová kontrola FITC : reagensie řady IOTest (Ref. A07795.).
- Tlumivý reakční roztok (PBS: 0,01 M fosforečnan sodný, 0,145 M chlorid sodný, pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatický přístroj k míchání vzorků (vortex).
- Průtokový cytometr.

POSTUP s REAGENCIÍ VERSALYSE

Pozn. Níže popsaná metoda je vhodná pro standardní aplikace. Vzorky a/nebo objemy roztoku VersaLyse se v určitých aplikacích Beckman Coulter mohou lišit. V těchto případech dodržujte pokyny uvedené v technickém návodu konkrétní aplikace.

Pro každý analyzovaný vzorek je třeba kromě testové zkumavky připravit ještě jednu zkumavku kontrolní, kde jsou buňky smíchány s izotypovou kontrolou (Ref. A07795.).

1. Přidejte 20 µl specifické konjugované protilátky IOTest ke každé testované zkumavce a 20 µl izotypické kontroly ke každé kontrolní zkumavce.
2. Do obou zkumavek přidejte 100 µl testovaného vzorku. Zkumavky jemně promíchejte na vortexu.
3. Inkubujte 15 až 20 minut při laboratorní teplotě (18 – 25 °C) bez přístupu světla.
4. Pokud je to nutné, proveďte lýzu červených krvinek. Dodržujte doporučení pro lyzační roztok, který používáte. Např. při použití roztoku VersaLyse (Ref. A09777) je podle příbalové informace nejvhodnější provést metodu s fixací doprovázející lýzu vzorku, která sestává z přidání 1 ml předem připravené směsi pro fixaci a lýzu ("Fix-and-Lyse"). Vzorek ihned promíchejte jednu vteřinu na vortexu a inkubujte 10 minut při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Jestliže vzorek neobsahuje erytrocyty, přidejte 2 ml PBS.
5. Při laboratorní teplotě centrifugujte 5 minut při 150 x g.
6. Odsajte supernatant.
7. Resuspendujte buněčnou peletu ve 3 ml PBS.
8. Opakujte krok 5.
9. Odsajte supernatant a resuspendujte buněčnou peletu v objemu:
0,5 ml nebo 1 ml PBS plus 0,1 % formaldehydu, pokud mají být preparáty uchovány po dobu kratší než 24 hodin. (0,1 % formaldehyd PBS lze získat ředěním 12,5 µl fixačního roztoku IOTest 3 (REF A07800) při koncentraci 10X na 1 ml PBS).
v objemu 0,5 ml nebo 1 ml PBS bez formaldehydu, pokud vzorky budou analyzovány do 2 hodin od zpracování.

Pozn.: Zpracované vzorky vždy uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C bez přístupu světla.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř musí shromáždit vlastní referenční hodnoty založené na skupině zdravých dárců vybraných z místní populace. Úvahu je třeba brát věk, pohlaví a etnickou příslušnost dárců, stejně jako další potenciální regionální rozdíly.

V našich laboratořích byla plná krev získaná od 10 zdravých dospělých dárců inkubována s výše uvedenou reagensií. Získané výsledky, které vyjadřují zastoupení částic pozitivně označených touto reagensií, jsou uvedeny v následující tabulce :

Lymfocyty	Počet	Průměr (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monocyty	Počet	Průměr (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulocyty	Počet	Průměr (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

Charakteristika výrobku

Data pro stanovení charakteristiky se získávají na základě výše uvedeného postupu z 24 hodin starého krevního vzorku odebraného do sterilních zkumavek, obsahujících sůl EDTA jako antikoagulační činidlo. Analýza se provádí během 2 hodin po imunologickém barvení.

SPECIFICITA

Molekula CD71, známá jako receptor transferinu nebo antigen T9, je homodimerní transmembránový glykoprotein o velikosti 190 kDa (3). CD71 se zapojuje do příjmu železa vazbou transferinu (4). Je exprimován retikuly, prekurzory erytrocytů, buňkami kapilárního endotelu v mozku (4,5). Všechny ostatní typy buněk exprimují CD71, pouze když vstupují do proliferace (4).

Monoklonální protilátka YDJ1.2.2 byla přiřazena antigenu CD71 na 5. pracovní konferenci HLDA pro diferenační antigeny lidských leukocytů (5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens) v Bostonu v USA v roce 1993 (kód WS: A006, sekce AA6) (3).

Reprodukovatelnost výsledků v rámci laboratoře

Bylo provedeno 12 stanovení procentuálního zastoupení pozitivních buněk na jednom vzorku. Měření proběhlo v jeden den na tomtéž průtokovém cytometru. Získané výsledky shrnuje následující tabulka:

Pozitivní buňky	Počet	Průměr (%)	SD	CV (%)
Lymfocyty CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Linearita

K testování linearity stanovení při použití této reagentie byly v různých poměrech smíchány buňky pozitivní buněčné linie ((JURKAT)) a buňky negativní buněčné linie ((FRN3,4,14)) tak, aby konečný počet buněk ve směsi byl konstantní a aby se poměr buněk pozitivní linie / negativní linie pohyboval v rozmezí 0 – 100 %.

Alikvoty byly zpracovány výše popsaným způsobem a byla provedena lineární regrese pro očekávané a získané hodnoty.

Specifita	Linear regression	Linearita (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

OMEZENÍ

- Výsledky získané průtokovou cytometrií mohou být chybné, pokud není průtokový cytometr řádně seřízen, nejsou správně nastaveny kompenzace překryvů fluorescence nebo v případě špatně umístěných oblastí.
- Reagentie dosud nebyla optimalizována pro použití v lyzační technice bez promývání, proto je vhodnější použít metodu lýzy s následným promýváním vzorku.
- Přesné a reprodukovatelné výsledky lze získat pouze pokud použité metody odpovídají postupům uvedeným v příbalovém letáku a jsou kompatibilní se zásadami správné laboratorní praxe.
- Konjugovaná protilátka obsažená v této reagentii je kalibrována tak, aby poskytovala co nejlepší poměr specifického signálu k nespecifickému. Z tohoto důvodu je důležité v každém testu dodržovat poměr objemu reagentie a objemu vzorku.
- V případě hyperleukocytózy, naředte krev pomocí PBS tak, abyste získali hodnotu přibližně 5×10^9 leukocytů/l (6).
- Za určitých patologických stavů, jako je těžké selhání ledvin nebo hemoglobinopatie, může být lýza erytrocytů pomalá, neúplná nebo dokonce nemožná. V takovém případě se doporučuje před barvením izolovat mononukleární buňky pomocí hustotního gradientu (např. Ficoll) (7).

Literární (REFERENCES) zdroje a příklady (EXAMPLES) jsou uvedeny v dodatku (APPENDIX).

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, stylizované logo a známky produktů a služeb společnosti Beckman Coulter uvedené v tomto dokumentu jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Beckman Coulter, Inc., ve Spojených státech amerických a dalších zemích.

Klíč k symbolům

Slovníček symbolů je k dispozici na adrese beckman.com/techdocs (číslo dokumentu B60062)

	Špecifikácia
Špecifickosť	CD71
Klon	YDJ1.2.2
Hybridom	X63 x balb/c
Imunogén	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Imunoglobulín	IgG1
Živočíšny druh	Myš
Purifikácia	Afinita Chromatografia
Fluorochróm	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Molárny pomer	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ excitácia	488 nm
Maximum emisie	525 nm
Tlmivý roztok	PBS pH 7,2 plus 2 mg/ml BSA a 0,1 % NaN ₃

IO Test Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 ml, 20 μ l / test

Na diagnostické použitie *In Vitro*

URČENÉ POUŽITIE

Táto protilátka konjugovaná s fluorochromom umožňuje metódou prietokovej cytometrie identifikovať a určiť počet buniek v populáciách, ktoré v ľudských biologických vzorkách exponujú antigén CD71

PRINCÍP

Tento test je založený na schopnosti špecifických monoklonálnych protilátok viazať sa na antigénne determinanty exprimované na leukocytoch.

Špecifické stanovenie leukocytov je vykonávané inkubovaním vzorky s reagensiou IO Test. Červené krvinky sú potom odstránené zo vzorky a leukocyty, ktoré lýzou nie sú ovplyvnené sú analyzované prietokovým cytometrom.

Prietokový cytometer meria rozptyl svetla a fluorescenciu buniek. Podľa týchto parametrov sú bunky lokalizované vo vnútri elektronicky vytvoreného okna definovaného histogramom, ktorý koreluje kolmý rozptyl svetla ("Side Scatter", SS) a rozptyl svetla v malom uhle ("Forward Scatter", FS). Ďalšie histogramy, kombinujúce dva rôzne parametre dostupné na cytometri, je možné využiť pri elektronickom výbere populácie buniek ("gatovanie") v závislosti na užívateľom zvolenej aplikácii.

Na základe fluorescencie vybraných buniek, ktoré dávajú pozitívny signál, sú odlišené označené častice od neoznačených. Výsledok je vyjadrený ako percentuálne zastúpenie pozitívnych častíc vo vzťahu ku všetkým časticiam vybraným pri elektronickom "gatovaní".

PRÍKLADY KLINICKÝCH APLIKÁCIÍ

Transferínový receptor (CD71) je exprimovaný na proliferujúcich bunkách vrátane neoplastických buniek, aktivovaných lymfocytov a buniek hematopoetických prekursorov. Expresia CD71 sa používa na imunofenotypové klastrovanie myelodysplastických syndrómov (1) ako aj na účely rozlišovania medzi bunkami plodu a matky (2).

ČINIDLÁ

Koncentrácia: Pozrite certifikát analýzy špecifický pre danú šaržu, ktorý nájdete na www.beckmancoulter.com.

VÝSTRAHA A OPATRENIA

1. Nepoužívajte reagensiu po dátume expirácie.
2. Nezamrazujte.
3. Pred použitím nechajte vytemperovať na laboratórnu teplotu (18 – 25 °C).
4. Obmedzte pôsobenie svetla na minimum.
5. Vyvarujte sa mikrobiálnej kontaminácie reagensie, ktorá môže byť príčinou chybných výsledkov
6. Roztoky protilátok obsahujú azid sodný (NaN₃), preto s nimi musí byť narábané opatrne. Nepoužívajte vnútorne a vyvarujte sa kontaktu reagensie s pokožkou, sliznicami a očami.
V kyslom prostredí môže z azidu sodného vznikáť potenciálne nebezpečná hydrazidová kyselina. Pokiaľ je treba reagensiu zlikvidovať, odporúča sa nariediť ju pred vylitím do odpadu veľkým množstvom vody, aby sa predišlo nahromadeniu azidu v kovovom potrubí a tým i riziku explózie.
7. Všetky vzorky krvi sa musia považovať za potenciálne infekčné a pri zaobchádzaní s nimi je treba dodržiavať zásady bezpečnosti práce (hlavne používať osobné ochranné pomôcky: rukavice, plášť a okuliare).
8. Nikdy nepipetujte ústami a vyvarujte sa kontaktu vzorky s pokožkou, sliznicami a očami.
9. Skúmavky s krvou a použitý jednorazový materiál je potrebné likvidovať spálením v špeciálnych kontajneroch.
10. Činidlá a odpad je nutné zlikvidovať v súlade s miestnymi predpismi.

KLASIFIKÁCIA RIZÍK PODĽA GHS

Nie je klasifikované ako nebezpečné.

SDS	Bezpečnostný list je dostupný na adrese beckman.com/techdocs
------------	--

SKLADOVANIE A STABILITA

Konjugované protilátky vo forme roztoku musia byť uchovávané pri 2 až 8 °C bez prístupu svetla predtým i potom, čo bola fľaštička otvorená.

Stabilita obsahu dosiaľ neotvorených fľaštičiek: viď dátum expirácie uvedený na štítku fľaštičku.

Stabilita otvorenej ampulky: činidlo je stabilné 180 dní.

VZORKY

Vzorky žilnej krvi musia byť odobrané do sterilných skúmaviek obsahujúcich EDTA ako antikoagulačné činidlo.

Vzorky by mali byť uchovávané bez miešania pri laboratórnej teplote (18 – 25 °C). Pred odobratím vzoriek z odberovej skúmavky je treba vzorky jemne premiešať.

Vzorky musia byť analyzované do 24 hodín od odberu.

ZNÁMKY ZNEHODNOTENIA

Akákoľvek zmena fyzického vzhľadu činidla môže byť príznakom znehodnotenia avtakom prípade sa činidlo nesmie používať.

Ak je poškodené balenie alebo ak získané údaje poukazujú na zmenu funkčnosti, obráťte sa na miestneho distribútora alebo použite nasledujúcu e-mailovú adresu:

OBSAH

Konzervačné činidlo azid sodný môže v kovovej kanalizačnej sieti vytvárať výbušné zlúčeniny. Viď bulletin NIOSH: Nebezpečenstvo výbušného azidu (16. 8. 1976).

Aby nedošlo k možnému nahromadeniu azidových zlúčenín, po likvidácii neriedeného činidla vypláchnite potrubie vodou. Likvidácia azidu sodného musí prebiehať v súlade s príslušnými miestnymi predpismi.

POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ NIE JE SÚČASŤOU SÚPRAVY:

- Skúmavky na odber vzoriek a materiál potrebný na odber.
- Automatické pipety s jednorazovými špičkami na 20, 100 a 500 µl.
- Plastové hemolyzačné skúmavky.
- Činidlo na lýzu červených krviniek s premývacím krokom zaradeným po lýze, napr. lyzačný roztok VersaLyse (Ref. A09777).
- Činidlo na fixáciu leukocytov, napr. fixačný roztok IOTest 3 (Ref. A07800).
- Izotypová kontrola FITC : reagencie rady IOTest (Ref. A07795.).
- Tlmivý reakčný roztok (PBS: 0,01 M fosforečnan sodný, 0,145 M chlorid sodný, Ph 7,2).
- Centrifúga.
- Automatický prístroj na miešanie vzoriek (vortex).
- Prietokový cytometer.

POSTUP S ČINIDLOM VERSALYSE

POZN. : Nižšie popísaná metóda je vhodná pre štandardné aplikácie. Vzorky a/alebo objemy roztoku VersaLyse sa v určitých aplikáciách Beckman Coulter môžu líšiť. V týchto prípadoch dodržujte pokyny uvedené v technickom návode konkrétnej aplikácie. Pre každú analyzovanú vzorku je potrebné

Pre každú analyzovanú vzorku je treba okrem testovej skúmavky pripraviť ešte jednu skúmavku kontrolnú, kde sú bunky zmiešané s izotypovou kontrolou (Ref. A07795.).

1. Do každej testovej skúmavky pridajte 20 µl špecifickej konjugovanej protilátky IOTest a do každej kontrolnej skúmavky 20 µl izotypickej kontroly.
2. Do oboch skúmaviek pridajte 100 µl testovanej vzorky. Skúmavky jemne premiešajte na vortexe.
3. Inkubujte 15 až 20 minút pri laboratórnej teplote (18 - 25 °C) bez prístupu svetla.
4. Pokiaľ je to nutné, vykonajte lýzu červených krviniek. Dodržujte odporúčanie pre lyzačný roztok, ktorý používate. Napr. pri použití roztoku VersaLyse (Ref. A09777) je podľa príbalovej informácie najvhodnejšie vykonať metódu s fixáciou sprevádzajúcou lýzu vzorky, ktorá pozostáva z prídania 1 ml predom pripravenej zmesi na fixáciu a lýzu ("Fix-a-Lyse"). Vzorku ihneď premiešajte jednu sekundu na vortexe a inkubujte 10 minút pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla. Ak vzorka neobsahuje erytrocyty, pridajte 2 ml PBS.
5. Pri laboratórnej teplote centrifugujte 5 minút pri 150 x g.
6. Odsajte supernatant.
7. Resuspendujte bunkovú peletu v 3 ml PBS.
8. Opakujte krok 5.
9. Odsajte supernatant a resuspendujte bunkový pelet v objeme:
0,5 ml alebo 1 ml PBS plus 0,1 % formaldehydu, ak sa preparáty budú skladovať kratšie ako 24 hodín. (0,1 % roztok PBS s formaldehydom získate zriedením 12,5 µl fixačného roztoku IOTest 3 (REF A07800) s koncentráciou 10X v 1 ml PBS).
v objeme 0,5 ml alebo 1 ml PBS bez formaldehydu, pokiaľ vzorky budú analyzované do 2 hodín od spracovania.

POZN.: Spracované vzorky vždy uchovávejte pri teplote 2 až 8 °C bez prístupu svetla.

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Každé laboratórium musí zhromaždiť vlastné referenčné hodnoty založené na skupine zdravých darcov vybraných z miestnej populácie. Do úvahy je treba brať vek, pohlavie a etnickú príslušnosť darcov, rovnako ako ďalšie potenciálne regionálne rozdiely.

V našich laboratóriách bola plná krv získaná od 10 zdravých dospelých darcov inkubovaná s vyššie uvedenou reagenciou. Získané výsledky, ktoré vyjadrujú zastúpenie častíc pozitívne označených touto reagenciou sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

Lymfocyty	Počet	Priemer (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monocyty	Počet	Priemer (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulocyty	Počet	Priemer (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

CHARAKTERISTIKA VÝROBKU

Údaje na stanovenie charakteristiky sa získavajú na základe vyššie uvedeného postupu z24 hodín starej krvnej vzorky odobranej do sterilných skúmaviek, obsahujúcich soľ EDTA ako antikoagulačné činidlo. Analýza sa vykonáva počas 2 hodín po imunologickom farbení.

ŠPECIFICITA

Molekula CD71, známa ako transferínový receptor alebo antigén T9, je 190 kDa homodimérový transmembránový glykoproteín (3). Molekula CD71 je zapojená do príjmu železa viazaním transferínu (4). Je exprimovaná retikulocytmi, erytroidnými prekursorami a kapilárnymi endotelialnými bunkami v mozgu (4,5). Všetky ostatné známe typy buniek exprimujú CD71 len pri vstupe do proliferácie (4).

Špecificita rozoznania antigénu CD71 monoklonálnou protilátkou YDJ1.2.2 bola potvrdená na 5. konferencii HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens v Boston, USA, v roku 1993 (WS kód: A006, sekcia AA6) (3).

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV V RÁMCI LABORATÓRIA

Bolo vykonaných 12 stanovení percentuálneho zastúpenia pozitívnych buniek na jednej vzorke. Meranie prebehlo v jeden deň na rovnakom prietokovom cytometri. Získané výsledky zhŕňa nasledujúca tabuľka:

Pozitívne bunky	Počet	Priemer (%)	SD	CV (%)
Lymfocyty CD71-FITC+	12	48,15	1,11	2,31

Linearita

Na testovanie linearity stanovenia pri použití tejto reagensie boli v rôznych pomeroch zmiešané bunky pozitívnej bunkovej línie ((JURKAT)) a bunky negatívnej bunkovej línie ((FRN3,4,14)) tak, aby konečný počet buniek v zmesi bol konštantný a aby sa pomer buniek pozitívnej línie / negatívnej línie pohyboval v rozmedzí od 0 - 100 %.

Alikvóty boli spracované vyššie popísaným spôsobom a bola vykonaná lineárna regresia pre očakávané a získané hodnoty.

Špecifickosť	Lineárna regresia	Linearita (R ²)
CD71-FITC	Y = 0,9915 X +1,082	0,9998

OBMEDZENIA

- Ak cytometer nie je správne nastavený, fluorescenčné prekryvy nie sú správne kompenzované a v prípade nesprávne umiestnených oblastí môže pri meraní na prietokovom cytometri dôjsť k chybným výsledkom.
- Reagencia dosiaľ nebola optimalizovaná pre použitie v lyzačnej technike bez premývania, preto je vhodnejšie použiť metódu lýzy s následným premývaním vzorky.
- Presné a reprodukovateľné výsledky možno získať len ak použité metódy zodpovedajú postupom uvedeným v príbalovom letáku a sú kompatibilné so zásadami správnej laboratórnej praxe.
- Konjugovaná protilátka obsiahnutá v tejto reagensii je kalibrovaná tak, aby poskytovala čo najlepší pomer špecifického signálu k nešpecifickému. Z tohto dôvodu je dôležité v každom teste dodržiavať pomer objemu reagensie a objemu vzorky.
- V teréne leukocytózy nariedte krv v PBS, aby bola výsledná koncentrácia približne 5×10^9 leukocytov/l (6).
- Pri určitých ochoreniach, ako sú napríklad závažné renálne zlyhanie alebo hemoglobínopatia, môže byť lýza erytrocytov pomalá, inkompletná, alebo dokonca nemožná. V takom prípade sa odporúča pred farbením odizolovať jednojadrové bunky na základe denzitného gradientu (napr. Ficoll) (7).

Literárne zdroje (REFERENCES) apríklady (EXAMPLES) sú uvedené v dodatku (APPENDIX).

OCHRANNÉ ZNÁMKY

Beckman Coulter, štylizované logo, a známky produktov a služieb spoločnosti Beckman Coulter spomenuté v tomto dokumente sú ochranné známky alebo registrované ochranné známky spoločnosti Beckman Coulter, Inc., v Spojených štátoch a ďalších krajinách.

Popis symbolov

Slovník symbolov je dostupný na adrese beckman.com/techdocs (číslo dokumentu B60062)

	Spesifikasyonlar
Özgünlük	CD71
Klon	YDJ1.2.2
Hibridoma	X63 x balb/c
İmmunogen	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
İmmunoglobülin	IgG1
Türler	Fare
Saflaştırma	Afinite kromatografisi
Florokrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Mol Oranı	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ uyarılma	488 nm
Emisyon piki	525 nm
Tampon	PBS pH 7,2 ve 2 mg / mL BSA ve %0,1 NaN ₃

IO Test Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 mL, 20 μ L / test

İn Vitro Diagnostik Kullanım için

KULLANIM AMACI

Bu florokrom-konjuge antikor biyolojik insan numuneleri içinde bulunan CD71 antijenini eksprese eden hücre popülasyonlarının akım sitometrisi ile tanımlanması ve sayılmasını sağlar.

PRENSİP

Bu test, spesifik monoklonal antikorların lökositler tarafından eksprese edilen antijenik belirleyicilere bağlanabilmesine dayanmaktadır.

Lökositlerin spesifik boyanması numunenin IO Test reaktifi ile inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir. Kırmızı hücreler daha sonra parçalanarak uzaklaştırılır ve bu işlemde etkilenmeyen lökositler akım sitometrisi ile analiz edilir.

Akım sitometrisi ışık difüzyonunu ve hücrelerdeki floresanı ölçer. İlgilenilen popülasyonun, ışığın dikey difüzyonunu (Side Scatter veya SS) ile dar-açılı ışığın difüzyonunu (Forward Scatter veya FS) ilişkilendiren bir histogram üzerinde tanımlanan elektronik pencere içerisinde sınırlandırılmasını mümkün kılar. Sitometre üzerinde mevcut farklı parametrelerin ikisini birleştiren diğer histogramlar kullanıcı tarafından seçilen uygulamaya dayanarak gating (kapılama) aşamasında yardımcı olarak kullanılabilir.

Sınırlandırılan hücrelerdeki floresan pozitif olarak boyanmış olayların boyanmamış olanlardan ayırt edilmesi amacıyla analiz edilir. Sonuçlar gating ile edinilmiş tüm oranlara kıyasla pozitif olayların yüzdesi olarak gösterilir.

KLİNİK UYGULAMA ÖRNEKLERİ

Transferrin reseptörü (CD71) neoplastik hücreler, aktive olmuş lenfositler ve hematopoetik prekürsör hücreler dahil olmak üzere çoğalan hücreler üzerinde eksprese edilir. CD71 ekspresyonu miyelodisplastik sendromların (1) immünofenotipik kümeleşmesinde ve fetal hücrelerin maternal hücrelerden ayırt edilmesinde kullanılmıştır (2).

REAKTİFLER

Konsantrasyon: www.beckmancoulter.com adresinde lota spesifik Analiz Sertifikasına bakın.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Reaktifi son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
2. Dondurmayın.
3. Kullanmadan önce oda sıcaklığına (18 – 25°C) gelmesini bekleyin.
4. Işığa maruz kalımı en aza indirin.
5. Reaktifleri mikrobiyal kontaminasyondan uzak tutun, aksi takdirde yanlış sonuçlar meydana gelebilir.
6. Sodyum azid (NaN₃) içeren antikor çözeltileri dikkatle kullanılmalıdır. Yutmayın ve deri, mukoza ve gözlerle herhangi bir şekilde temasından kaçınin. Ayrıca, asidik bir ortamda sodyum azid potansiyel olarak tehlikeli hidrazoik asit oluşturabilir. Reaktifin atılması gerekiyorsa, kanalizasyon sistemine dökülmeden önce bol miktarda su içinde seyreltilmesi tavsiye edilir, böylelikle sodyum azidin metal borular içinde birikmesi ve patlama riski önlenmiş olur.
7. Tüm kan numunelerinin potansiyel olarak enfeksiyöz olabileceği düşünülmelidir ve bu numuneler dikkatle kullanılmalıdır (özellikle: koruyucu eldiven, önlük ve gözlüklerin kullanılması).
8. Asla ağızla pipetleme yapmayın ve numunelerin cilt, mukoza ve gözlerle herhangi bir şekilde temasından kaçınin.
9. Çalışma sırasında kullanılan kan tüpleri ve tek kullanımlık malzemeler yakma işlemi için tasarlanmış spesifik kaplarda imha edilmelidir.
10. Reaktifler ve atık yerel gerekliliklere göre ortadan kaldırılmalıdır.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Tehlikeli olarak sınıflandırılmamıştır

SDS	Güvenlik Veri Sayfası beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir
------------	--

SAKLAMA VE STABİLİTE

Konjuge sıvı formlar flakon açılmadan önce ve açıldıktan sonra 2 ila 8°C arasında saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır.

Kapalı flakonun stabilitesi: flakon üzerindeki son kullanma tarihine bakınız.

Açık flakon stabilitesi: reaktif 180 gün stabildir.

ÖRNEKLER

Venöz kan numuneleri antikoagülan olarak EDTA tuzu içeren steril tüpler kullanılarak alınmalıdır.

Numuneler oda sıcaklığında (18 – 25°C) saklanmalıdır ve çalkalanmamalıdır. Numuneler test örneği alınmadan önce yavaşça sallanarak homojen hale getirilmelidir.

Numuneler damardan alındıktan sonra 24 saat içerisinde analiz edilmelidir.

BOZULMA BELİRTİLERİ

Reaktiflerin fiziksel görüntüsünde herhangi bir değişiklik bozulmaya dair bir gösterge olabilir ve bu durumda reaktif kullanılmamalıdır.

Paketleme bozulması durumunda veya elde edilen veriler performansta biraz değişiklik gösteriyorsa lütfen yerel distribütörünüzle irtibat kurun veya şu e-posta adresini kullanın:

İÇİNDEKİLER

Sodyum azid koruyucu maddesi metal kanalizasyon hatlarında patlayıcı bileşimler oluşturabilir. NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76) (NIOSH Bülteni: Patlayıcı Azid Tehlikesi (16.08.1976)) belgesine bakın.

Azid bileşenlerinin olası birikimini engellemek amacıyla, seyreltilmemiş reaktif boşalttıktan sonra atık borularını bol suyla yıkayın. Sodyum azid, uygun yerel düzenlemelere göre bertaraf edilmelidir.

GEREKLİ OLAN ANCAK KİT İLE BİRLİKTE VERİLMİYEN MALZEMELER:

- Numune alma için gerekli olan numune alma tüpleri ve malzemeleri.
- 20 için tek kullanımlık uçlara sahip otomatik pipetler, 100 ve 500 µL.
- Plastik hemoliz tüpleri.
- Parçalama işleminden sonra yıkama adımlı kırmızı hücre parçalama reaktif. Örnek: VersaLyse (Ref. A09777).
- Lökosit sabitleme reaktif. Örnek: IOTest 3 Sabitleme Çözeltisi (Ref. A07800).
- İzotipik kontrol FITC : IOTest reaktif (Ref. A07795.).
- Tampon (PBS: 0,01 M sodyum fosfat; 0,145 M sodyum klorür; pH 7,2).
- Santrifüj.
- Otomatik karıştırıcı (Vorteks tipli).
- Akım sitometrisi.

VERSALYSE REAKTİFİ ile PROSEDÜR

Not: Aşağıdaki prosedür standart uygulamalar için geçerlidir. Belirli Beckman Coulter uygulamaları için numune ve/veya VersaLyse hacimleri farklı olabilir. Böyle bir durum söz konusu ise, uygulama teknik broşüründeki talimatları izleyin.

Analiz edilen her numune için, test tüpüne ek olarak içinde hücrelerin izotipik kontrol (Ref. A07795.) ile karıştırılacağı bir kontrol tüpü gereklidir.

1. Her test tüpüne 20 µL spesifik IOTest konjüge antikor ekleyin ve her kontrol tüpüne 20 µL izotipik kontrol ekleyin.
2. Her iki tüpe 100 µL test numunesi ekleyin. Tüpleri yavaşça vorteksleyin.
3. Oda sıcaklığında (18 – 25°C) ışıktan koruyarak 15 – 20 dakika boyunca inkübe edin. Daha sonra kırmızı hücrelerin parçalanma işlemini, gerekirse kullanılan parçalama reaktifi ile ilgili tavsiyeleri izleyerek gerçekleştirin.
4. Daha sonra kırmızı hücrelerin parçalanma işlemini, gerekirse kullanılan parçalama reaktifi ile ilgili tavsiyeleri izleyerek gerçekleştirin. Örnek olarak, VersaLyse (Ref. A09777) kullanmak istiyorsanız, broşüre bakın ve tercihen kullanıma hazır "Fix-and-Lyse" karışımından 1 mL eklenmesini içeren "konkomitant sabitleme ile" olarak adlandırılan prosedürü takip edin. Hemen bir saniye kadar vorteksleyin ve oda sıcaklığında ışıktan koruyarak 10 dakika boyunca inkübe edin. Numune kırmızı hücreler içermiyorsa, 2 mL PBS ekleyin.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 150 x g'de santrifüjleyin.
6. Aspirasyon ile süpernatantı alın.
7. 3 mL PBS kullanarak hücre pelletini tekrar süspansiyon hale getirin.
8. Adım 5'i tekrarlayın.
9. Aspirasyon ile süpernatantı alın ve şunu kullanarak hücre pelletini tekrar süspansiyon hale getirin.

Preparatlar 24 saatten az tutulacaksa, 0,5 mL veya 1 mL PBS'nin yanı sıra %0,1 formaldehid. (%0,1 formaldehid PBS, 1 mL PBS içinde 10X konsantrite IOTest 3 Fiksasyon Solüsyonundan (REF A07800) 12,5 µL seyreltilerek elde edilebilir).

Preparatlar 2 saat içerisinde analiz edilecekse, formaldehidsiz 0,5 mL veya 1 mL PBS.

Not: Her zaman preparatları ışıktan koruyarak 2 - 8°C'de saklayın.

BEKLENEN DEĞERLER

Her laboratuvar yerel popülasyondaki bir grup sağlıklı donöre dayanarak bir referans değerler listesi derlemelidir. Bu derleme yaş, cinsiyet ve etnik grup ile birlikte herhangi diğer potansiyel bölgesel farklılıklar dikkate alınarak yapılmalıdır.

Bizim laboratuvarlarımızda, 10 sağlıklı yetişkinden alınan tam kan numuneleri yukarıda açıklanan reaktif kullanılarak işleme tabi tutulmuştur. Bu reaktif ile söz konusu pozitif olayların sayısı için elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmektedir :

Lenfositler	Numaralandırma	Ort. (%)	SD	(%) CV
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monositler	Numaralandırma	Ort. (%)	SD	(%) CV
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granülositler	Numaralandırma	Ort. (%)	SD	(%) CV
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

PERFORMANS

Performans verileri, antikoagülan olarak EDTA tuzu içeren steril tüplerde daha önce toplanan 24-saatlik kan numuneleri hakkında yukarıda tanımlanan prosedür kullanılarak elde edilir. Analizler immün boyamayı izleyen 2 saat içinde gerçekleştirilir.

ÖZGÜNLÜK

Transferrin reseptörü veya T9 antijeni olarak da bilinen CD71 molekülü, 190 kDa ağırlığında, homodimerik bir transmembran glikoproteindir (3). CD71 transferrine bağlanarak demir alımında rol oynar (4). Retikülositler, eritroid prekürsörler ve beyinde kapiler epitel hücreleri tarafından eksprese edilir (4,5). Bilinen diğer tüm hücre tipleri sadece proliferasyon fazına girdiklerinde CD71 eksprese eder (4).

YDJ1.2.2 monoklonal antikorunu Boston, A.B.D.'de 1993'de gerçekleştirilen 3. HLDA (Human Leucocyte Differentiation Antigens) Workshopunda CD71'e atanmıştır (WS Kodu: A006, Bölüm AA6) (3).

LABORATUVAR İÇİ TEKRARLANABİLİRLİK

Pozitif bir hedefin boyanma yüzdesi ile ilgili 12 ölçüm aynı günde ve aynı sitometre kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda özetlenmektedir:

Pozitif Hedef	Numaralandırma	Ort. (%)	SD	(%) CV
Lenfositler CD71-FITC+	12	48,15	1,11	2,31

Doğrusallık

Bu reaktifin boyama özelliğinde doğrusallığın test edilmesi için bir pozitif hücre hattı ((JURKAT)) ve bir negatif hücre hattı ((FRN3,4,14)) nihai hücre sayısı sabit kalacak şekilde farklı oranlarda karıştırılmıştır, böylelikle karışımın pozitif hat/negatif hat oranı %0 ila 100 arasında bulunmuştur.

Numuneden alınan küçük kısımlar yukarıda tarif edilen prosedürle boyanmış ve beklenen değerler ile gözlenen değerler arasındaki lineer regresyon hesaplanmıştır.

Özgünlük	Lineer regresyon	Doğrusallık (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

SINIRLAMALAR

- Eğer sitometre mükemmel şekilde hizalanmamış, floresan sızıntıları düzgün şekilde kompanse edilmemiş ve bölgeler dikkatli bir şekilde konumlandırılmamışsa, akış sitometrisi yanlış sonuçlar verebilir.
- Bu reaktif "yıkamasız" parçalama tekniği için optimize edilmediğinden, yıkama adımlı bir RBC parçalama tekniğinin kullanılması tercih edilir.
- Kullanılan prosedürler teknik prospektüse uygun olarak ve iyi laboratuvar uygulamalarına göre olduğu sürece doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecektir.
- Bu reaktifin konjuge antikorunu en iyi spesifik sinyal/spesifik olmayan sinyal oranını sunacak şekilde kalibre edilmiştir. Bu nedenle, her testte reaktif hacmi/numune hacmi oranına bağlı kalınması önemlidir.
- Hiperlökositoz durumunda kanı PBS ile yaklaşık 5×10^9 lökosit/L (6) elde edecek şekilde seyreltin.
- Şiddetli böbrek yetmezliği veya hemoglobinopatiler gibi bazı hastalık durumlarında eritrosit lizisi yavaş, eksik ve hatta imkansız olabilir. Bu durumda mononükleer hücreleri boyama öncesinde bir dansite gradiyenti (örneğin Ficoll) kullanılarak ayırmak önerilir (7).

Örnekler (Examples) ve Referanslar (References) için Ek (Appendix) kısmına bakın.

TİCARİ MARKALAR

Bu belgede belirtilen Beckman Coulter, stilize logo ve Beckman Coulter ürün ve hizmet markaları, Beckman Coulter, Inc. firmasının ABD'de ve diğer ülkelerdeki ticari veya tescilli ticari markalarıdır.

Sembol Anahtarı

Semboller Sözlüğü beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir (belge numarası B60062)

	Спецификации
Специфичность	CD71
Клон	YDJ1.2.2
Гибридома	X63 x balb/c
Иммуноген	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Иммуноглобулин	IgG1
Вид	Мышь
Очистка	Аффинная хроматография
Флуорохром	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
концентрация	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ возбуждения	488 nm
Пик эмиссии	525 nm
Буфер	ФСБ pH 7,2 плюс 2 мг / мл БСА и 0,1% NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 мл, 20 мкл / тест

Применять только для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данное антитело, конъюгированное с флуорохромом, позволяет идентифицировать популяции клеток, экспрессирующих антиген CD71, и подсчитывать их количество в биологических образцах человека с помощью проточной цитометрии.

ПРИНЦИП

Данный тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с антигенными детерминантами, которые экспрессированы лейкоцитами.

Специфическая окраска лейкоцитов осуществляется путем инкубации образца с реактивом IOTest. После этого эритроциты лизируют, а лейкоциты, на которые процесс лизиса не оказывает воздействия, исследуют методом проточной цитометрии.

Проточный цитометр измеряет рассеивание света клетками и их флуоресценцию. Он позволяет устанавливать границы целевой популяции клеток внутри электронного окна, задаваемого на гистограмме, которая соотносит рассеивание света под прямым углом (боковое рассеивание - Side Scatter или SS) с рассеиванием света под малым углом (прямое рассеивание - Forward Scatter или FS). На этапе гейтинга можно воспользоваться и другими гистограммами, которые содержат по два различных параметра, измеряемых цитометром, в зависимости от приложения, избранного пользователем.

Флуоресценция ограниченной популяции клеток анализируется, чтобы отличить положительно окрашенные события от неокрашенных. Результаты выражают в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа событий, зарегистрированных при помощи гейтинга.

ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ

Рецептор трансферрина (CD71) экспрессируется на пролиферирующих клетках, включая неопластические, активированных лимфоцитах и предшественниках гемопоэтических клеток. Исследование экспрессии CD71 проводится при иммунофенотипировании миелодиспластических синдромов (1), а также для дифференцирования клеток матери и плода (2).

РЕАГЕНТЫ

Концентрация: см. сертификат анализа для партии на Интернет-сайте www.beckmancoulter.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реактив после истечения срока годности.
2. Не замораживайте реагент.
3. Перед использованием доведите температуру реактива до комнатной (18 – 25°C).
4. Воздействие света на реагент должно быть сведено к минимуму.
5. Избегайте микробного загрязнения реактивов во избежание ложных результатов.
6. Растворы антител, содержащие азид натрия (NaN₃), требуют осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза.
Кроме того, в кислой среде из азид натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азид натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.
7. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные и принимать соответствующие меры предосторожности (работать в защитных перчатках, халатах и очках).
8. Запрещается набирать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания образцов на кожу, слизистые оболочки и глаза.
9. Для удаления в отходы пробирок из-под образцов крови, а также одноразовых материалов, использованных при обработке образцов, их помещают в специальные контейнеры и направляют на сжигание.
10. Реагенты и отходы следует утилизировать в соответствии с местными требованиями.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Не классифицируется как опасное вещество

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

Жидкие конъюгаты до и после вскрытия флакона следует хранить при температуре от 2 до 8°C в защищенном от света месте.

Стабильность красителя в нераспечатанном флаконе: указана на этикетке флакона.

Стабильность открытого флакона: реагент стабилен на протяжении 180 дней.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отбирать в стерильные пробирки, содержащие соль ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Образцы следует хранить при комнатной температуре (18 – 25°C), не встряхивая. Перед забором аликвоты для исследования образец следует перемешать путем легкого встряхивания пробирки, чтобы обеспечить однородное распределение клеток по объему.

Образцы подлежат анализу в течение 24 часов после венепункции.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любое изменение физического внешнего вида реактивов может быть признаком их распада. Такие реактивы не следует использовать.

В случае нарушения упаковки или если полученные данные свидетельствуют об изменениях показателей, обратитесь к своему местному дистрибьютору или по следующему адресу электронной почты:

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азиды натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH) «Взрывоопасные азиды (16.08.76)».

Во избежание накопления азидных соединений промыть сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азиды натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР

- Пробирки для образцов и материалы для забора образцов.
- Автоматические пипетки с одноразовыми кончиками на 20, 100 и 500 мл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Реагент для лизиса эритроцитов с отмывкой после лизиса. Например: VersaLyse (Ref. A09777).
- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Изотипический контроль FITC : Реагент IOTest (Ref. A07795.).
- Буфер (ФСБ: 0,01 М фосфат натрия; 0,145 М хлорид натрия; pH 7,2).
- Центрифуга.
- Автоматический встряхиватель (типа Vortex).
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА с РЕАГЕНТОМ VERSALYSE

Примечание: Описанная ниже процедура действительна для стандартных приложений. Для ряда приложений Beckman Coulter объемы образца и реактива VersaLyse могут различаться. В таких случаях необходимо следовать инструкциям, приведенным в описании приложения.

Для каждого анализируемого образца помимо тест-пробирки необходимо иметь контрольную пробирку, в которой клетки образца смешивают с изотипическим контролем (Ref. A07795.).

1. Добавьте 20 мл специфичного конъюгированного антитела IOTest в каждую пробирку для анализа и 20 мл изотипического контроля в каждую контрольную пробирку.
2. В тест-пробирку и контрольную пробирку вносят по 100 мкл образца. Осторожно встряхивают пробирки на приборе Vortex.
3. Инкубируют в течение 15 – 20 мин при комнатной температуре (18 – 25°C) в защищенном от света месте.
4. Затем производят лизис эритроцитов, при необходимости пользуясь рекомендациями по использованию реактива для лизиса. Например, если используется VersaLyse (Ref. A09777), следует обратиться к листку-вкладышу и рекомендуется воспользоваться процедурой «с одновременной фиксацией», которая состоит в добавлении 1 мл смеси «Fix-and-Lyse» приготовляемой ex tempore. Немедленно встряхивают на Vortex в течение одной секунды, а затем инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если образец не содержит эритроцитов, добавляют 2 мл ФСБ.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 150 g при комнатной температуре.
6. Удаляют супернатант аспирацией.
7. Ресуспендируют клеточный осадок в 3 мл ФСБ.
8. Повторяют этап 5.
9. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток, используя для этого:

0,5 мл или 1 мл PBS плюс 0,1% формальдегида, если препараты следует хранить менее 24 часов. (PBS с 0,1% формальдегида можно получить путем разведения 12,5 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 (REF A07800) в концентрации 10x в 1 мл PBS).

0,5 мл или 1 мл ФСБ без формальдегида, если препараты предполагается анализировать в течение ближайших 2 часов.

Важно: Независимо от способа пробоподготовки готовые пробы необходимо хранить при температуре 2–8°C в защищенном от света месте.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна определить собственные референсные интервалы на основании исследования образцов здоровых доноров местной популяции. При этом необходимо учитывать возраст, пол и этническую принадлежность доноров, а также другие возможные межрегиональные различия.

В наших лабораториях реактивом, описанным выше, было обработано 10 образцов крови здоровых взрослых людей. Результаты определения числа положительных целевых событий с использованием данного реактива приведены в следующих таблицах :

Лимфоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Моноциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Гранулоциты	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Данные о работе системы получены с применением описанной выше процедуры на образцах крови, собранных за 24 часа до исследования в стерильные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Анализ выполнен не позднее чем через 2 часа после иммунного окрашивания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Молекула CD71, известная как рецептор трансферрина или T9 антиген – гомодимерный трансмембранный гликопротеин с весом 190 kDa (3). CD71 вовлечен в поглощении железа при связывании трансферрина (4). Экспрессируется ретикулоцитами, эритроидными предшественниками и эндотелиальными клетками капилляров мозга (4,5). Все другие типы клеток экспрессируют CD71 только когда пролиферируют (4).

CD71 был присвоен моноклональным антителом YDJ1.2.2 на 5-м совещании по антигенам дифференцировки человека, состоявшемся в 1993 в Бостоне, США WS Code: A006, Section AA6) (3).

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение одного и того же дня с использованием одного и того же цитометра было выполнено 12 измерений процентного содержания окрашенных клеток в целевой популяции. Полученные результаты обобщены в следующей таблице:

Целевая популяция	Номер	Средняя величина (%)	Станд. откл. (SD)	CV (%)
Лимфоциты CD71-FITC +	12	48,15	1,11	2,31

Линейность

Чтобы проверить линейность окрашивания для данного реактива, клетки положительной линии ((JURKAT)) и клетки отрицательной линии ((FRN3,4,14)) смешали в различных пропорциях так, чтобы все полученные смеси содержали одно и то же конечное число клеток, а отношение числа положительных клеток к числу отрицательных клеток находилось в диапазоне от 0 до 100%.

Аликвоты были окрашены в соответствии с описанной выше методикой. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия.

Специфичность	Линейная регрессия	Линейность (R2)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
2. Рекомендуется выполнять лизис эритроцитов с отмывкой, поскольку данный реагент не оптимизирован для процедуры лизирования без отмывки.
3. Точные и воспроизводимые результаты получаются, если использованные процедуры выполняются в соответствии с требованиями прилагаемой инструкции и стандартами надлежащей лабораторной практики.
4. Конъюгированное антитело в составе данного реактива откалибровано таким образом, чтобы обеспечить наилучшее отношение специфического сигнала к неспецифическому. Поэтому важно, чтобы соотношение объемов реактива и образца при каждом определении было одним и тем же.
5. В случае гиперлейкоцитоза разведите кровь в PBS, чтобы получить значение приблизительно в 5×10^9 лейкоцитов/л (6).
6. При определенных заболеваниях (например, тяжелой форме почечной недостаточности или гемоглобинопатиях) лизис эритроцитов может оказаться замедленным, неполным или невозможным. В этом случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки с помощью градиента плотности (например, фиколл) перед окрашиванием (7).

Примеры (Examples) и ссылки (References) смотрите в Приложении (Appendix).

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, стилизованный логотип и упоминаемые здесь знаки продукции и услуг Beckman Coulter являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками корпорации Beckman Coulter в Соединенных Штатах и других странах.

Ключ символов

Глоссарий символов доступен на сайте beckman.com/techdocs (номер документа B60062)

	Specificații
Specificitate	CD71
Clonă	YDJ1.2.2
Hibridom	X63 x balb/c
Imunogen	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Imunoglobulină	IgG1
Specie	Șoarece
Purificare	Cromatografia afinităților
Fluorocrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Raport molar	FITC/Ig: 5,0 - 8,5
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

CD71-FITC

REF IM0483 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 CD71 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

Receptorul de transferină (CD71) este exprimat pe celulele care proliferază, inclusiv celulele neoplazice, limfocitele activate și celulele precursor hematopoietice. Exprimarea CD71 a fost folosită pentru gruparea imunofenotipică a sindroamelor mielodisplastice (1), precum și pentru diferențierea celulelor fetale de cele maternelor (2).

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.
- 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 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 izotipic (REF A07795).

- 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.
- 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.
- 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.
- 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 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 10 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 (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monocite	Număr	Medie (%)	Deviație standard	valoare limită (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulocite	Număr	Medie (%)	Deviație standard	valoare limită (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

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

Molecula CD71, cunoscută și ca receptorul de transferină sau antigenul T9, este o glicoproteină transmembranară homodimerică de 190 kDa (3). Molecula CD71 este implicată în asimilarea fierului prin legarea transferinei (4). Este exprimată de reticulocite, precursorii eritrocitelor, și de celulele endoteliale capilare din creier (4, 5). Toate celelalte tipuri de celule cunoscute exprimă CD71 numai când intră în faza de proliferare (4).

Anticorpul monoclonal YDJ1.2.2 a fost asociat cu CD71 la 5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (al cincilea simpozion internațional consacrat antigenilor umani de diferențiere a leucocitelor), desfășurat în Boston, U.S.A., în 1993 (cod WS: A006, secțiunea AA6) (3).

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 +CD71-FITC	12	48,15	1,11	2,31

Liniaritate

Pentru a testa liniaritatea colorării acestui reactiv, au fost mixate o linie pozitivă de celule (JURKAT) 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)
CD71-FITC	Y = 0,9915 X +1,082	0,9998

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 (6).
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 (7).

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)

	Specifikacije
Specifičnost	CD71
Klon	YDJ1.2.2
Hibridom	X63 x balb/c
Imunogen	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Imunoglobulin	IgG1
Vrste	Miš
Pročišćavanje	Afinitetna hromatografija
Fluorohrom	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Molarni opseg	FITC / Ig: 5,0 - 8,5
λ nadraživanje	488 nm
Vrhunac emitovanja	525 nm
Pufer	PBS pH 7,2 plus 2 mg / ml BSA i 0,1% NaN ₃

IOTest Conjugated Antibody CD71-FITC

REF IM0483 100 tests; 2 ml, 20 μ l / testu

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu

NAMENA

Ovo fluorohromno-konjugovano antitelo omogućava identifikaciju i numeraciju populacije ćelija izražavajući CD71 prisustvo antigena u ljudskim biološkim uzorcima pomoću protočne citometrije.

PRINCIP

Ovaj test je zasnovan na sposobnosti određenih antitela da se vežu za antigenske determinante izražene leukocitima.

Posebno bojenje leukocita obavlja se inkubacijom uzorka sa IOTest reagensom. Crvene ćelije se zatim uklanjaju lizom i leukociti, koji nisu pogođeni ovim postupkom, analiziraju se protokom citometrije.

Protočni citometar meri difuziju svetla i fluorescentnost ćelija. Omogućava razgraničavanje interesne populacije u okviru elektronskog prozora definisanog na histogramu, koji uspostavlja vezu između ortogonalne difuzije svetla (bočno rasejavanje ili SS) i difuzije svetla malog ugla (rasejavanje napred ili RN). Mogu se koristiti i drugi histogrami koji kombinuju dva različita parametra, dostupni pri citometriji, kao podrška fazi otvaranja/zatvaranja ćelije, u zavisnosti od primene koju je korisnik odabrao.

Fluorescencija ograničenih ćelija se analizira kako bi se razlikovali pozitivno obojeni događaji od neobojenih događaja. Rezultati su prikazani kao procenat pozitivnih događaja u odnosu na sve događaje dobijene regulacijom.

PRIMERI KLINIČKIH PRIMENA

Transferinski receptor (CD71) se eksprimira na proliferativnim ćelijama, uključujući neoplastične ćelije, aktivirane limfocite i hematopoetske prekurzorske ćelije. Ekspresija CD71 korišćena je za imunofenotipsko grupisanje mijelodisplastičnih sindroma (1), kao i za razlikovanje ćelija fetusa od ćelija majke (2).

REAGENSI

Koncentracija: Pogledajte Sertifikat analize specifičan za ovu seriju na www.beckmancoulter.com.

UPOZORENJE I MERE OPREZA

1. Ne koristite reagens nakon roka trajanja.
2. Ne zamrzavajte.
3. Pustite da dostigne sobnu temperaturu (18 – 25°C) pre upotrebe.
4. Svedite izloženost svetlu na minimum.
5. Izbegavajte mikrobiološku kontaminaciju reagensa, jer to može dovesti do netačnih rezultata.
6. Treba pažljivo rukovati rastvorima antitela koji sadrže natrijum azid (NaN₃). Samo za spoljnu upotrebu i izbegavajte kontakt sa kožom, sluzokožom i očima.
Štaviše, u kiseloj sredini, natrijum azid može da formira potencijalno opasnu azotvodoničnu kiselinu. Ako je potrebno da se odloži, preporučuje se da se reagens razblaži u velikim količinama vode pre sipanja u kanalizaciju kako bi se izbeglo nagomilavanje natrijumazida u metalnim cevima i sprečila opasnost od eksplozije.
7. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno infektivnim i njima se mora pažljivo rukovati (naročito: nošenje zaštitnih rukavica, ogrtača i naočara).
8. Nikada ne izvlačite ustima i izbegavajte svaki kontakt uzoraka sa kožom, sluzokožom i očima.
9. Epruvete za krv i i potrošni materijal za rukovanje treba odložiti u ad hok kontejnere koji se koriste za spaljivanje otpada.
10. Reagense i otpad treba ukloniti u skladu sa lokalnim propisima.

GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

Nije klasifikovano kao opasno

SDS	Bezbednosni list je dostupan na adresi beckman.com/techdocs
------------	---

SKLADIŠTENJE I STABILNOST

Konjugovani tečni oblici se moraju čuvati na temperaturi između 2 i 8°C i zaštićeni od svetla, pre i nakon otvaranja bočice.

Stabilnost zatvorene bočice: pogledajte rok trajanja na bočici.

Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 180 dana.

UZORCI

Krv iz vene se mora uzeti pomoću sterilnih epruveta koje sadrže EDTA so kao antikoagulans.

Uzorci treba da se čuvaju na sobnoj temperaturi (18 – 25°C) i ne smeju da se mučkaju. Uzorci treba da se homogenizuju blagim mućkanjem pre uzimanja probnog uzorka.

Uzorci moraju da se analiziraju najkasnije 24 sata nakon venepunkcije.

DOKAZI POGORŠANJA

Svaka promena u fizičkom izgledu reagensa može da ukazuje na dotrajalost/pogoršanje stanja i taj reagens ne bi smeo da se koristi.

U slučaju dotrajalosti/pogoršanja stanja pakovanja ili ako dobijeni podaci ukazuju na promenu učinka, kontaktirajte svog lokalnog prodavca ili koristite sledeću adresu e-pošte:

SADRŽAJ

Konzervans natrijum azid može formirati eksplozivna jedinjenja u metalnim odvodnim cevima. Pogledajte „NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard“ (16.08.1976.) (Bilten Nacionalnog instituta za bezbednost i zdravlje na radu: Opasnost od eksplozivnih azida).

Da biste izbegli moguće taloženje jedinjenja azida, isperite cevi za otpad vodom nakon odbacivanja nerazblaženog reagensa. Odbacivanje natrijum azida mora biti u skladu sa odgovarajućim lokalnim propisima.

POTREBNI MATERIJALI KOJI SE NE ISPORUČUJU UZ KOMPLET:

- Epruvete za uzimanje uzoraka i materijal neophodan za uzimanje uzoraka.
- Automatske pipete sa vrhovima za jednokratnu upotrebu za 20, 100 i 500 µl.
- Plastične epruvete za hemolizu.
- Reagens za lizu crvenih krvnih zrnaca sa fazom ispiranja nakon lize. Na primer: VersaLyse (Ref. A09777).
- Reagens za fiksiranje leukocita. Na primer: IOTest 3 rastvor fiksativa (Ref. A07800).
- Izotipska kontrola FITC: IOTest reagens (REF A07795).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijum fosfat, 0,145 M natrijum hlorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska mešalica (vrtložna).
- Protočni citometar.

POSTUPAK sa VERSALYSE REAGENSOM

Napomena: Postupak naveden u nastavku važi za standardne primene. Zapremine uzorka i/ili VersaLyse reagensa za određene Beckman Coulter primene se mogu razlikovati. U tom slučaju, pratite instrukcije na tehničkom uputstvu za primenu.

Za svaki analiziran uzorak je pored epruvete za testiranje potrebna i jedna kontrolna epruveta za uzorak u kojoj se ćelije mešaju u prisustvu izotipske kontrole (REF A07795.).

1. Dodajte 20 µl specifičnih IOTest konjugovanih antitela svakoj probnoj epruveti, i 20 µl izotipske kontrole svakoj kontrolnoj epruveti.
2. Dodajte 100 µl uzorka za testiranje u obe epruvete za uzorak. Pažljivo izmešajte epruvete za uzorak u vrtložnoj mešalici.
3. Inkubirajte 15 do 20 minuta na sobnoj temperaturi (18 - 25°C), zaštićeno od svetlosti.
4. Zatim izvršite liziranje crvenih krvnih ćelija prateći preporuke za korišćeni reagens za liziranje, ukoliko je to potrebno. Na primer, ako želite da koristite VersaLyse (REF A09777) pogledajte uputstvo i po mogućnosti sledite postupak pod nazivom „uz istovremeno fiksiranje“, koji se sastoji od dodavanja 1 ml „Fix-and-Lyse“ smeše pripremljene na licu mesta. Odmah izmešajte u vrtložnoj mešalici jednu sekundu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti. Ako uzorak ne sadrži crvene krvne ćelije, dodajte 2 ml PBS-a.
5. Centrifugirajte 5 minuta na 150 x g, na sobnoj temperaturi.
6. Usisajte supernatant.
7. Ponovo suspendujte talog ćelija pomoću 3 ml PBS-a.
8. Ponovite korak br. 5.
9. Usisajte supernatant i ponovo suspendujte talog ćelija pomoću:

0,5 ml ili 1 ml PBS-a plus 0,1% formaldehida, ako će se preparati čuvati kraće od 24 sati. (PBS sa 0,1% formaldehida se može dobiti razređivanjem 12,5 µl IOTest 3 fiksativnog rastvora (REF A07800) sa njegovom 10X koncentracijom u 1 ml PBS-a).

0,5 ml ili 1 ml PBS-a bez formaldehida, ako će se preparati analizirati u roku od 2 sati.

NAPOMENA: U svim slučajevima, držite preparate na temperaturi od 2 do 8°C i zaštićene od svetlosti.

OČEKIVANE VREDNOSTI

Svaka laboratorija mora sastaviti listu referentnih vrednosti zasnovanih na grupi zdravih donora iz lokalne populacije. To se mora obaviti uzimajući u obzir starost, pol i etničku grupu, kao i bilo koje druge moguće regionalne razlike.

U našim laboratorijama, uzorci pune krvi 10 zdravih odraslih osoba su tretirani pomoću prethodno opisanog reagensa. Rezultati dobijeni za broj pozitivnih događaja od interesa sa ovim reagensom navedeni su u tabelama u nastavku:

Limfociti	Broj	Srednja vrednost (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Monociti	Broj	Srednja vrednost (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulociti	Broj	Srednja vrednost (%)	SD	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

PERFORMANSE

Podaci o delovanju dobijeni su pomoću prethodno opisanog postupka na 24 sata starim uzorcima krvi koji su prethodno prikupljeni sterilnim epruvetama za uzorke sa EDTA solju kao antikoagulansom. Analiza se vrši u roku od 2 sata od imunobojenja.

SPECIFIČNOST

Molekul CD71, poznat kao transferinski receptor ili T9 antigen, je homodimerni transmembranski glikoprotein molekulske težine 190 kDa (3). CD71 je uključen u unos gvožđa kroz vezivanje transferina (4). Ekspirira se retikulocitima, eritroidnim prekurzorima i kapilarnim endotelnim ćelijama u mozgu (4, 5). Svi ostali poznati tipovi ćelija ekspiriraju CD71 samo kada uđu u proliferaciju (4).

Monoklonsko antitelo YDJ1.2.2 je dodeljeno CD71 tokom konferencije „5th HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ (Peta HLDA konferencija o ljudskim antigenima leukocitne diferencijacije), održane u Bostonu, SAD, 1993. godine (Kod WS: A006, Odeljak: AA6) (3).

MEĐULABORATORIJSKA REPRODUKTIVNOST

Istog dana i upotrebom istog citometra, izvršena su 12 merenja procenta bojenja pozitivnog cilja. Dobijeni rezultati su dati u sledećoj tabeli:

Pozitivni cilj	Broj	Srednja vrednost (%)	SD	CV (%)
Limfociti +CD71-FITC	12	48,15	1,11	2,31

Linearnost

Da bi se testirala linearnost bojenja ovog reagensa, pozitivna ćelijska linija (JURKAT) i negativna ćelijska linija (FRN3,4,14) su mešane u različitim proporcijama sa konstantnim konačnim brojem ćelija, tako da se odnos pozitivne ćelijske linije i negativne ćelijske linije u mešavini kretao od 0 do 100%.

Alikvoti su obojeni pomoću prethodno opisanog postupka i izračunata je linearna regresija između očekivanih vrednosti i dobijenih vrednosti.

Specifičnost	Linearna regresija	Linearnost (R ²)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može da pruži netačne rezultate ako citometar nije savršeno usklađen, ako prodori fluorescencije nisu pravilno nadoknađeni i ukoliko regioni nisu pažljivo pozicionirani.
2. Poželjno je da koristite tehniku RBC lize sa korakom za ispiranje jer ovaj reagens nije optimizovan za tehniku lize „bez ispiranja“.
3. Tačni i reproduktivni rezultati će se dobiti sve dok su postupci koji se koriste u skladu sa tehničkim uputstvom za umetanje i usklađeni sa dobrim laboratorijskim praksama.
4. Konjugovana antitela ovog reagensa su kalibrisana tako da ponude najbolji odnos specifičnog/nescifičnog signala. Zato je važno da se pri svakom testu pridržavate odnosa zapremine reagensa/zapremine uzorka.
5. U slučaju hiperleukocitoze, razredite krv u PBS-u tako da se dobije vrednost od oko 5×10^9 leukocita/L (6).
6. U pojedinim stadijuma bolesti, kao što je teška bubrežna insuficijencija ili hemoglobinopatija, liza crvenih krvnih zrnaca može biti spora, nepotpuna ili čak nemoguća. U tom slučaju, preporučuje se da se izoluju mononuklearne ćelije pomoću gradijenta gustine (na primer „Ficoll“) pre bojenja (7).

Pogledajte Dodatak za primere i reference.

ŽIGOVI

Beckman Coulter, stilizovani logotip i Beckman Coulter robni i servisni žigovi koji se navode u ovom dokumentu su žigovi ili registrovani žigovi kompanije Beckman Coulter, Inc. u Sjedinjenim Američkim Državama i drugim zemljama.

Ključ za simbole

Rečnik simbola je dostupan na adresi beckman.com/techdocs (broj dokumenta B60062)

	Especificações
Especificidade	CD71
Clone	YDJ1.2.2
Hibridoma	X63 x balb/c
Imunógeno	MLA 144 (Gibbon leukaemic cell line)
Imunoglobulina	IgG1
Espécie	Camundongo
Purificação	Cromatografia de afinidade
Fluorocromo	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
Razão molar	FITC/Ig: 5,0 - 8,5
λ de excitação	488 nm
Pico de emissão	525 nm
Tampão	PBS com pH de 7,2 mais 2 mg/mL de BSA e 0,1% de NaN_3

Anticorpo conjugado

IOTest

CD71-FITC

REF IM0483 100 testes; 2 mL, 20 μL /teste

Para uso em diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

Esse anticorpo conjugado com fluorocromo permite a identificação e numeração das populações de células que expressam o antígeno CD71 presente em amostras biológicas humanas utilizando a citometria de fluxo.

PRINCÍPIO

Este teste baseia-se na capacidade que os anticorpos monoclonais específicos têm de se unir aos antígenos determinantes expressados por leucócitos.

A coloração específica dos leucócitos é realizada através da incubação da amostra com o reagente IOTest. Os glóbulos vermelhos são então removidos por lise e os leucócitos, os quais não são afetados por este procedimento, são analisados por citometria de fluxo.

O citômetro de fluxo mede a difusão de luz e a fluorescência das células. Ele possibilita a delimitação da população de interesse na janela eletrônica definida pelo histograma, que correlaciona a difusão ortogonal da luz (dispersão lateral ou SS [Side Scatter]) e a difusão de luz de ângulo estreito (dispersão frontal ou FS [Forward Scatter]). Outros histogramas que combinam dois dos diferentes parâmetros disponíveis no citômetro podem ser usados como auxiliar na fase de delimitação, dependendo da aplicação escolhida pelo usuário.

A fluorescência das células delimitadas é analisada para distinguir os eventos corados positivamente dos não corados. Os resultados são expressos como porcentagem de eventos positivos em relação a todos os eventos adquiridos pela delimitação.

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES CLÍNICAS

O receptor da transferrina (CD71) é expresso em células em proliferação, incluindo células neoplásicas, linfócitos ativados e células precursoras hematopoéticas. A expressão de CD71 foi usada para a aglomeração imunofenotípica de síndromes mielodisplásicas (1), assim como para discriminação de células fetais e maternas (2).

REAGENTES

Concentração: consulte o certificado de análise específico do lote em www.beckmancoulter.com.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não use o reagente após o prazo de validade.
2. Não congele.
3. Deixe atingir a temperatura ambiente antes de usar (18–25°C).
4. Evite a exposição à luz.
5. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, pois isso pode gerar falsos resultados.
6. As soluções de anticorpos contendo azida sódica (NaN_3) devem ser manipuladas com cuidado. Não faça uso interno e evite o contato com a pele, mucosas e olhos.
Além disso, em meio ácido, a azida sódica pode formar um ácido hidrazoico potencialmente perigoso. Se precisar descartar essa substância, recomenda-se que o reagente seja diluído em um grande volume de água antes de colocá-lo no sistema de drenagem para evitar o acúmulo da azida sódica nos canos de metal e o risco de explosão.
7. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infecciosas e devem ser manipuladas com cuidado (em particular: uso de luvas, jalecos e óculos de proteção).
8. Nunca coloque a pipeta na boca e evite qualquer contato das amostras com a pele, mucosas e olhos.
9. Os tubos de sangue e o material descartável utilizado para manuseio deve ser descartado em recipientes ad hoc destinados a incineração.
10. Os reagentes e os resíduos devem ser eliminados de acordo com os requisitos locais.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

Não classificado como perigoso

SDS	A Folha de dados de segurança está disponível em beckman.com/techdocs
------------	---

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

As formas líquidas conjugadas devem ser mantidas entre 2 e 8°C e protegidas da luz, antes e depois do frasco ter sido aberto.

Estabilidade do frasco fechado: veja o prazo de validade no frasco.

Estabilidade do frasco aberto: o reagente é estável por 180 dias.

AMOSTRAS

Sangue venoso deve ser coletado usando tubos estéreis contendo um sal de EDTA como anticoagulante.

As amostras devem ser mantidas em temperatura ambiente (18–25°C) e não devem ser agitadas com força. As amostras devem ser homogeneizadas por agitação suave antes de ser retirada a amostra para o teste.

As amostras devem ser analisadas dentro das 24 horas que se seguem à coleta.

EVIDÊNCIA DE DETERIORAÇÃO

Qualquer alteração no aspecto físico dos reagentes poderá indicar deterioração e o reagente não deverá ser utilizado.

No caso de deterioração da embalagem ou se os dados obtidos mostrarem alguma alteração no desempenho, entre em contato com o distribuidor local ou use o seguinte endereço de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

CONTEÚDO

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos nos canos de escoamento metálicos. Consulte o NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Boletim do NIOSH [Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional]: perigos de explosão de azida) (16/08/1976).

Para evitar a possível acumulação de compostos de azida, enxágue os canos de escoamento com água após o descarte do reagente não diluído. O descarte da azida sódica deve ser efetuado de acordo com as normas locais apropriadas.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

- Tubos de amostra e material necessário para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 20, 100 e 500 µL.
- Tubos plásticos de hemólise.
- Reagente de lise de glóbulos vermelhos com fase de lavagem depois da lise. Por exemplo: VersaLyse (REF A09777).
- Reagente de fixação de leucócitos. Por exemplo: Solução fixadora IOTest 3 (REF A07800).
- Controle isotópico FITC: reagente IOTest (REF A07795).
- Tampão (PBS: 0,01 M fosfato de sódio; 0,145 M cloreto de sódio; pH 7,2).
- Centrifugadora.
- Misturador automático (tipo vórtex).
- Citômetro de fluxo.

PROCEDIMENTO com o REAGENTE VERSALYSE

Observação: o procedimento descrito a seguir é válido para aplicações padrões. Os volumes das amostras e/ou do VersaLyse para algumas aplicações da Beckman Coulter podem ser diferentes. Se este for o caso, siga as instruções no folheto técnico da aplicação.

Para cada amostra analisada, além do tubo de teste, é necessário um tubo de controle no qual as células são misturadas na presença do controle isotópico (REF A07795.).

1. Adicione 20 µL de anticorpos conjugados de IOTest específicos a cada tubo de teste e 20 µL do controle isotópico a cada tubo de controle.
2. Adicione 100 µL da amostra de teste a ambos os tubos. Agite os tubos no vórtex cuidadosamente em vórtex cuidadosamente.
3. Incube por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente (18–25°C), protegido da luz.
4. Em seguida, execute a lise dos glóbulos vermelhos, se necessário, seguindo as recomendações do reagente de lise utilizado. Por exemplo, se quiser usar VersaLyse (REF A09777), consulte o folheto e siga, preferencialmente, o procedimento “com fixação concomitante”, que consiste em adicionar 1 mL da mistura de “Fix-and-Lyse” preparada extemporaneamente. Agite imediatamente em vórtex por 1 segundo e incube por 10 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Se a amostra não contiver glóbulos vermelhos, adicione 2 mL de PBS.
5. Centrifugue por 5 minutos a 150 x g e a temperatura ambiente.
6. Retire o sobrenadante por aspiração.
7. Ressuspenda o precipitado celular usando 3 mL de PBS.
8. Repita a etapa 5.
9. Retire o sobrenadante por aspiração e ressuspenda o precipitado celular usando:
0,5 mL ou 1 mL de PBS mais 0,1% de formaldeído, se as preparações forem mantidas por menos de 24 horas. (É possível obter uma solução PBS com 0,1% de formaldeído diluindo-se 12,5 µL de Solução fixadora IOTest 3 [REF A07800] na sua concentração de 10X em 1 mL de PBS.)
0,5 mL ou 1 mL de PBS sem formaldeído, se as preparações forem analisadas no prazo de 2 horas.

Observação: mantenha sempre as preparações entre 2 e 8°C, protegidas da luz.

VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deve compilar uma lista de valores de referência com base em um grupo de doadores saudáveis da população local. Deve-se tomar em conta a idade, o sexo e o grupo étnico, bem como qualquer outra diferença regional possível.

Em nossos laboratórios, amostras de sangue total de 10 adultos saudáveis foram tratadas usando o reagente anteriormente descrito. Os resultados obtidos para a contagem de eventos de interesse positivos com este reagente são apresentados nas tabelas a seguir:

Linfócitos	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD71-FITC+	10	10,87	2,96	27,26

Mon	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD71-FITC+	10	22,35	8,88	39,73

Granulócitos	Número	Média (%)	DP	CV (%)
CD71-FITC+	10	1,81	1,16	64,02

DESEMPENHO

Os dados de desempenho são obtidos usando o procedimento descrito anteriormente em amostras de sangue com 24 horas, coletadas previamente em tubos estéreis com sal de EDTA como anticoagulante. A análise é executada no prazo de 2 horas após a imunocoloração.

ESPECIFICIDADE

A molécula CD71, conhecida como receptor de transferrina ou antígeno T9, é uma glicoproteína transmembrana homodimérica de 190 kDa (3). A CD71 está envolvida na absorção de ferro mediante ligação com a transferrina (4). Ela é expressada por reticulócitos, precursores eritroides e células endoteliais capilares do cérebro (4, 5). Todos os outros tipos de células conhecidos expressam CD71 somente ao entrar em proliferação(4).

O anticorpo monoclonal YDJ1.2.2 foi atribuído ao CD71 no 5º HLDA Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Workshop sobre HLDA de diferenciação de antígenos de leucócitos humanos), realizado em Boston, EUA, em 1993 (código WS: A006, seção: AA6) (3).

REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL

No mesmo dia e usando o mesmo citômetro, foram realizadas 12 medições da porcentagem de coloração de um alvo positivo. Os resultados obtidos são resumidos na tabela a seguir:

Alvo positivo	Número	Média (%)	DP	CV (%)
Linfócitos +CD71-FITC	12	48,15	1,11	2,31

Linearidade

Para testar a linearidade da coloração deste reagente, foram misturadas uma linha celular positiva (JURKAT) e uma linha celular negativa (FRN3,4,14), em diferentes proporções, com um número final constante de células, mas de modo que a razão linha positiva/linha negativa da mistura estivesse dentro do intervalo 0–100%.

As alíquotas foram coradas usando o procedimento descrito acima e foi calculada a regressão linear entre os valores observados e os esperados.

Especificidade	Regressão linear	Linearidade (R ²)
CD71-FITC	$Y = 0,9915 X + 1,082$	0,9998

LIMITAÇÕES

1. A citometria de fluxo pode produzir resultados falsos se o citômetro não for alinhado perfeitamente, se os vazamentos de fluorescência não forem corretamente compensados e se as regiões não forem cuidadosamente posicionadas.
2. É preferível utilizar a técnica de lise de RBC com a etapa de lavagem quando o reagente não tiver sido otimizado para técnicas de lise “sem lavagem”.
3. Serão obtidos resultados precisos e reproduzíveis desde que os procedimentos utilizados estejam em conformidade com o folheto técnico e sejam compatíveis com as boas práticas de laboratório.
4. O anticorpo conjugado deste reagente é calibrado de modo a oferecer a melhor razão entre sinal específico/sinal não específico. Desse modo, é importante aderir à razão de volume de reagente/volume da amostra em cada teste.
5. No caso de hiperleucocitose, dilua o sangue em PBS até obter um valor de aproximadamente 5×10^9 leucócitos/L (6).
6. Em alguns estados de doença, tais como insuficiência renal grave ou hemoglobinopatia, a lise dos glóbulos vermelhos pode ser lenta, incompleta ou até mesmo impossível. Nesse caso, recomenda-se isolar as células mononucleadas usando um gradiente de densidade antes da coloração (por exemplo, Ficoll) (7).

Consulte o apêndice para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logotipo estilizado e as marcas dos produtos e serviços da Beckman Coulter contidos neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e em outros países.

Legenda dos símbolos

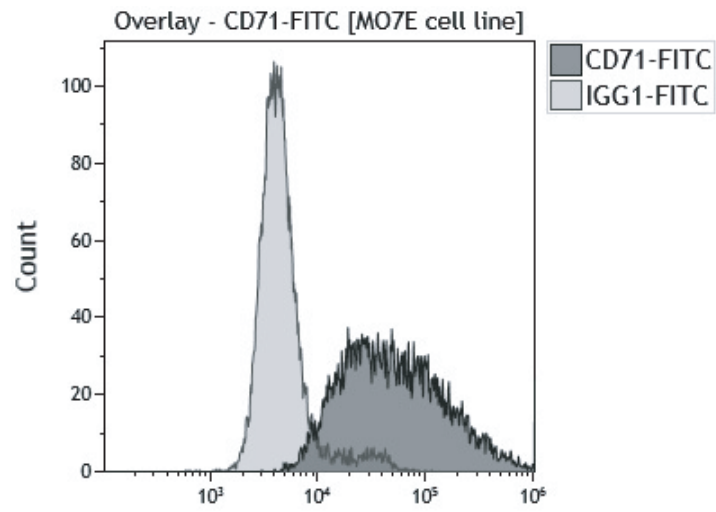
O Glossário de símbolos está disponível em beckman.com/techdocs (número do documento B60062)

APPENDIX

- EXAMPLES

Staining is with IOTest CD71-FITC Conjugated Antibody.

Acquisition is performed with a Beckman Coulter Navios flow cytometer equipped with the Navios analysis software.



REFERENCES

1. Maynadie M, Picard F, Husson B, Chatelain B, Cornet Y, Le Roux G, Campos L, Dromelet A, Lepelley P, Jouault H, Imbert M, Rosenwadj M, Verge V, Bissieres P, Raphael M, Bene MC, Feuillard J; Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL). Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. 2002, *Blood*. 100, 2349-56.
2. Bayrak-Toydemir P, Pergament E, Fiddler M. Applying a test system for discriminating fetal from maternal cells. 2003, *Prenat Diagn*. 23, 619-24.
3. Trowbridge, I.S., "Overview of CD71", 1995, *Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens*. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press, 1139-1141.
4. Goding, J.W., Dubljevic, V., Sali, A., "CD71 workshop panel report", 1996, *Leukocyte typing VI, White cell Differentiation Antigens*, Kishimoto, T., et al., Eds., Garland Publishing, Inc., 524-527.
5. Taetle, R., "The role of transferrin receptors in hemopoietic cell growth", 1990, *Exp. Hematol.*, 18, 360-365.
6. H42-A2 Vol.27 No. 16. P30. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline - Second Edition.
7. Ibrahim FF, Ghannam MM, Ali FM., "Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients"., 2002. *Ren Fail.*, Nov;24(6):779-90.

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial
CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil
CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telefone: 0800-771-8818



IMMUNOTECH S.A.S. a Beckman Coulter Company, 130, avenue de Lattre de Tassigny,
BP 177, 13276 Marseille cedex 9, France, 33-491 172 727