



IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 tests; 6 x 5 mL
2 x 0.1 mL / test

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français (FR)	8
Deutsch (DE)	15
Italiano (IT)	22
Español (ES)	29
Português Portugal (PT-PT)	36
Dansk (DA)	43
Svenska (SV)	50
Norsk (NO)	57
Suomi (FI)	64
Ελληνικά (EL)	71
日本語 (JP)	78
中文 (ZH-CN)	85
Lietuviškai (LT)	91
Magyar (HU)	98
Polski (PL)	105
Čeština (CZ)	112
Slovenčina (SK)	119
한국어 (KO)	126
Türkçe (TR)	132
Русский (RU)	139
eesti keel (ET)	146
Hrvatski (HR)	153
Български (BG)	160
中文 (ZH-TW)	167
Română (RO)	173
Slovenščina	180
Србија (SR)	187
Latviešu (LV)	194
Українська (UK)	201
Português Brasil (PT-BR)	208
Nederlands (NL)	215
Tiếng Việt (VI)	222
Қазақша	229
APPENDIX	236
REFERENCES	237

	Reagent 1	Reagent 2
	Fixation agent	Permeability agent
Formulation	Liquid	Liquid
Active substance	Formaldehyde	Saponine
Volume	5 mL	5 mL
Number of vials	3 vials	3 vials
Volume per test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 tests; 6 x 5 mL
2 x 0.1 mL / test

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

IntraPrep consists of two ready-to-use reagents, which induce permeability in the cytoplasmic membrane of leucocytes for the demonstration of intracellular antigenic determinants by means of monoclonal fluorescent antibodies. IntraPrep is used to prepare biological samples for analysis by flow cytometry. It has been optimized in order to minimize the non-specific staining in this type of analysis (1,2,3,4).

PRINCIPLE

As a first step, cells are fixed with reagent 1. After washing, permeability is induced with reagent 2 and remaining erythrocytes are lysed. During this stage, the cells are brought into contact with conjugated monoclonal antibodies specific for intracellular antigenic determinants. The leucocytes are then analyzed by flow cytometry.

The demonstration of surface antigenic determinants nevertheless remains possible. In this case, the specific conjugated monoclonal antibodies are incubated before fixation.

The flow cytometer measures light diffusion and the fluorescence of cells. It makes possible the localization 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.

INTENDED USER

This product is intended for laboratory professional use.

SAMPLES

Venous blood or bone marrow samples must be taken using sterile tubes containing an EDTA salt or ACD or heparin as the anticoagulant.

The samples should be kept at room temperature (18 – 25°C) and not shaken. The sample should be homogenized by gentle agitation prior to taking the test sample.

The samples must be analyzed within 24 hours of venipuncture.

WARNING AND PRECAUTIONS

1. Do not use the reagent beyond the expiry date.
2. Do not freeze.
3. Minimize exposure to light.
4. Avoid microbial contamination of the reagents, or false results may occur.
5. Reagent 1 contains formaldehyde. Formaldehyde is toxic and allergenic. It is thought to be a carcinogenic agent.
6. Reagent 2 contains Sodium Azide (NaN₃). It must 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

Reagent 1: Fixation

DANGER



H302

Harmful if swallowed.

H313

May be harmful in contact with skin

H314

Causes severe skin burns and eye damage.

H317

May cause an allergic skin reaction.

H341

Suspected of causing genetic defects.

H350

May cause cancer.

H370

Causes damage to organs.

P201

Obtain special instructions before use.

P280

Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.

P303+P361+P353

IF ON SKIN (or hair): Rinse skin with water.

P305+P351+P338

IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P310

Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

Methanol 1 - 2%

Formaldehyde 5 - 10%



Safety Data Sheet is available at beckman.com/techdocs

STORAGE AND STABILITY

IntraPrep is stored at 18 – 25°C.

Stability of closed vial: the reagent is stable for 517 days.

Stability of opened vial: the reagent is stable for 90 days.

See lot specific Certificate of Analysis at www.beckman.com.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any change in the physical appearance of the reagents may indicate deterioration and the reagent should not be used.

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

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 10, 20, 50, 100 and 500 µL.
- Plastic haemolysis tubes.

- Specific monoclonal antibodies (mAb).
- Negative controls.
- Leucocyte fixation reagent. For example : IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Buffer (PBS: 0.01 M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PROCEDURE

A - Intracytoplasmic staining

The number of red blood cells present in the sample should be less than 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Dilute if necessary in PBS.

The number of leucocytes present in the sample should be less than $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Dilute if necessary in PBS.

For each sample analyzed, in addition to the test tube, one control tube can be added in which the cells are mixed in the presence of the negative control, corresponding to the specific staining chosen.

1. Add 50 μL of the test sample to each tube.
2. Add 100 μL of reagent 1 to the each tube. Vortex vigorously immediately after each addition.
3. Incubate for 15 minutes at room temperature (18 – 25°C).
4. Add 4 mL of PBS to each tube.
5. Centrifuge for 5 minutes at 300 x g at room temperature.
6. Remove the supernatant by aspiration.
7. Add 100 μL of the reagent 2 to each tube. DO NOT VORTEX, leave reagent 2 to diffuse naturally into the cell pellet.
8. Incubate for 5 minutes at room temperature (18 – 25°C) WITHOUT SHAKING.
9. Shake slowly by hand for 2 to 3 seconds.
10. Add the necessary amount of mAb (specific for an intracytoplasmic antigenic determinant) to each test tube and if necessary, the appropriate amount of the negative control to each control tube.
11. Gently vortex tube by tube.
12. Incubate for 15 minutes at room temperature (18 – 25°C) protected from light.
13. Add 4 mL of PBS to each tube.
14. Centrifuge for 5 minutes at 300 x g at room temperature.
15. Remove the supernatant by aspiration and resuspend the cell pellet in 0.5 or 1 mL of IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) at its working concentration (1X). Thus fixed, the preparations can be stored between 2 and 8°C away from light for 24 hours.

B - Intracytoplasmic and membranous staining

The number of red blood cells present in the sample should be less than 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Dilute if necessary with PBS.

The number of leucocytes in the sample should be less than $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Dilute if necessary with PBS.

For each sample analyzed, in addition to the test tube, one control tube can be added in which the cells are mixed in the presence of the negative control, corresponding to the specific staining chosen.

1. Add 50 μL of the test sample to each tube.
2. Add the necessary amount of mAb (specific for a membranous antigenic determinant) to each test tube and if necessary, add the appropriate amount of negative control to each control tube.
3. Gently vortex tube by tube.
4. Incubate for 15 minutes at room temperature (18 – 25°C) protected from light.
5. Add 100 μL of reagent 1 to the each tube. Vortex vigorously immediately after each addition.
6. Incubate for 15 minutes at room temperature (18 – 25°C).
7. Add 4 mL of PBS to each tube.
8. Centrifuge for 5 minutes at 300 x g at room temperature.
9. Remove the supernatant by aspiration.
10. Add 100 μL of the reagent 2 to each tube. DO NOT VORTEX, leave reagent 2 to diffuse naturally into the cell pellet.

11. Incubate for 5 minutes at room temperature (18 – 25°C) WITHOUT SHAKING.
12. Shake slowly by hand for 2 to 3 seconds.
13. Add the necessary amount of mAb (specific for an intracytoplasmic antigenic determinant) to each test tube and if necessary, the appropriate amount of the negative control to each control tube.
14. To each control tube, add 20 µL of isotopic control.
15. Gently vortex tube by tube.
16. Incubate for 15 minutes at room temperature (18 – 25°C) protected from light.
17. Add 4 mL of PBS to each tube.
18. Centrifuge for 5 minutes at 300 x g at room temperature.
19. Remove the supernatant by aspiration and resuspend the cell pellet in 0.5 or 1 mL of IOtest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) at its working concentration (1X). Thus fixed, the preparations can be stored at between 2 and 8°C and away from light for 24 hours.

PERFORMANCE

Performance data are obtained using the procedure described above on less than 24 hour-old blood samples previously collected in sterile tubes with EDTA salt as anticoagulant. Analysis is performed within 2 hours following immunostaining.

PRECISION

The percent positive values were determined using Whole Blood and Bone Marrow. Each sample was run 4 times, twice a day for 1 day on 2 instruments using 2 lots of IntraPrep Permeabilization Reagent. Measurements (% positive) were made on Navios flow cytometer. Analysis was conducted based on the CLSI method EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods.

Our acceptance criteria is dependent on the number of positive events measured for each population:

- If positive event <1500, CV <15%
- If positive event >1500, CV <10%

Whole Blood EDTA:

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Purity							
Number of positive events (Mean) = 8877							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	2.29	1.82	6.47	2.25	1.65	5.82	7.09
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Recovery							
Number of positive events (Mean) = 8877							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	0.40	1.00	0.81	0.39	0.25	0.65	1.34
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Monocytes							
Number of positive events (Mean) = 1070							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.24	2.37	4.37	1.18	1.19	4.01	5.10
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Granulocytes							
Number of positive events (Mean) = 13246							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	0.09	0.03	0.16	0.04	0.03	0.12	0.16
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Whole Blood HEPARIN:

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Purity							
Number of positive events (Mean) = 6824							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.33	1.17	2.74	1.65	1.66	1.73	3.40
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Recovery							
Number of positive events (Mean) = 6824							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	2.92	2.40	3.01	0.55	0.64	0.34	3.89
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Monocytes							
Number of positive events (Mean) = 961							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	2.02	0.96	5.17	2.32	3.74	2.94	5.74
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Granulocytes							
Number of positive events (Mean) = 20742							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.09	1.10	2.46	1.03	1.08	1.92	2.89
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Whole Blood ACD:

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Purity							
Number of positive events (Mean) = 12355							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.91	1.60	3.54	1.55	1.35	2.65	4.18
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Recovery							
Number of positive events (Mean) = 12355							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	0.33	0.35	1.06	0.31	0.33	0.95	1.16
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Monocytes							
Number of positive events (Mean) = 1483							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.52	1.27	4.80	1.18	1.51	4.30	5.11
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Granulocytes							
Number of positive events (Mean) = 32715							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	0.97	0.85	2.83	0.88	0.79	2.54	3.08
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Bone Marrow EDTA:

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Purity							
Number of positive events (Mean) = 8808							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.16	0.89	2.98	0.72	2.32	1.46	3.19
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranous staining = Lymphocytic Recovery							
Number of positive events (Mean) = 8808							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	0.37	0.61	1.34	0.31	0.90	0.92	1.50
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Monocytes							
Number of positive events (Mean) = 2212							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	1.97	1.00	4.11	1.00	1.06	3.44	4.34
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmic staining on Granulocytes							
Number of positive events (Mean) = 33181							
	Inter-Operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-run	Intra-run	Total
CV (%)	0.11	0.29	0.37	0.10	0.13	0.33	0.48
RESULTS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LYMPHOCYTIC PURITY AND RECOVERY

Lymphocytic purity and recovery have been evaluated according to the recommendations of the CDC (5). The blood of 10 healthy donors sampled in EDTA, Heparin and ACD and 5 bone marrows were labeled with a mixture of monoclonal antibodies CD45-FITC and CD14-PE. The mean values of the recovery and purity as well as the range are given in the following tables:

Whole Blood EDTA		
Parameter	Recovery	Purity
Average	93.6	89.7
Min/Max	86.1 / 97.6	83.5 / 95.5

Whole Blood HEPARIN		
Parameter	Recovery	Purity
Average	94.3	87.6
Min/Max	84.9 / 97.7	81.5 / 94.3

Whole Blood ACD		
Parameter	Recovery	Purity
Average	94.2	94.6
Min/Max	91.1 / 98.5	87.6 / 97.7

Bone Marrow EDTA		
Parameter	Recovery	Purity
Average	80.7	71.8
Min/Max	78.3 / 85.8	60.1 / 83.4

LIMITATIONS

1. Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned perfectly, if fluorescence leaks have not been correctly compensated for and if the regions have not been carefully positioned.
2. Certain antigenic determinants can be sensitive to formaldehyde or to saponine. Each laboratory must validate the conditions for use of monoclonal antibodies.
3. Accurate and reproducible results will be obtained as long as the procedures used are in accordance with the technical insert leaflet and compatible with good laboratory practices.
4. This reagent has been optimized so as to offer the best specific signal/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the ratio of reagent volume/number of leucocytes and erythrocytes in every test.
5. In the case of hypercellularity, dilute the specimen in PBS so as to obtain less than 5×10^9 leucocytes/L and less than 6×10^{12} red blood cells/L (6).
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.

ADDITIONAL INFORMATION

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with identical regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on In vitro Diagnostic Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorized representative and to your national authority.

REVISION HISTORY

REVISION AF:	Release date : January 2021
REVISION AW:	
Updates to comply with the Beckman Coulter Global labelling Policy and according to IVD-R (EU)2017/746 requirements:	
Added sections	Intended User, Precision, Lymphocytic Recovery and Purity, Additional Information, Revision History
Added information	See sections Warning and Precautions, Storage and Stability, Limitations
Updated sections	Warning and Precautions, GHS Hazard Classification, Storage and Stability, Evidence of Deterioration, Procedure, Performance
Removed sections	Intra-Laboratory Reproducibility

Symbols Key

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

	Réactif 1	Réactif 2
	Fixateur	Perméabilisant
Forme	Liquide	Liquide
Principe actif	Formaldéhyde	Saponine
Volume	5 mL	5 mL
Nombre de flacons	3 flacons	3 flacons
Volume par test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 tests ; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / test

Pour une utilisation en Diagnostic *In Vitro*

UTILISATION

IntraPrep comprend deux réactifs prêts à l'emploi qui permettent de perméabiliser la membrane cytoplasmique des leucocytes pour la mise en évidence, au moyen d'anticorps monoclonaux fluorescents, de déterminants antigéniques intracellulaires. IntraPrep s'utilise pour préparer des échantillons biologiques destinés à être analysés par cytométrie en flux. Il a été optimisé pour minimiser les marquages non spécifiques dans ce type d'analyse (1,2,3,4).

PRINCIPE

Les cellules sont dans un premier temps fixées avec le réactif 1. Après lavage, elles sont perméabilisées avec le réactif 2 et les érythrocytes présents sont lysés. Lors de cette étape, les cellules sont mises en contact avec les anticorps monoclonaux conjugués spécifiques de déterminants antigéniques intracellulaires. Les leucocytes sont ensuite analysés par cytométrie en flux.

La mise en évidence de déterminants antigéniques de surface reste néanmoins possible. Dans ce cas, les anticorps monoclonaux conjugués spécifiques sont incubés avant la fixation.

Le cytomètre en flux mesure la diffusion de la lumière ainsi que la fluorescence des cellules. Il permet de circonscrire 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 petits angles ("Forward Scatter" ou FS). D'autres histogrammes combinant deux des différents paramètres disponibles sur le cytomètre sont utilisables comme supports à l'étape de fenêtrage électronique en fonction de l'application choisie par l'utilisateur.

La fluorescence des cellules délimitées est analysée de manière à distinguer les événements colorés positifs de ceux qui ne le sont pas. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'événements positifs par rapport à tous les événements acquis grâce à la méthode de gating.

UTILISATEUR PRÉVU

Ce produit est destiné à un usage professionnel en laboratoire.

ÉCHANTILLONS

Les prélèvements de sang veineux ou de moelle osseuse doivent s'effectuer sur des tubes d'échantillon stériles contenant un sel d'EDTA, de l'ACD, ou de l'héparine 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 la ponction veineuse.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption.
2. Ne pas congeler.
3. Minimiser l'exposition à la lumière.
4. Éviter la contamination microbienne des réactifs, ou des résultats erronés peuvent se produire.
5. Le réactif 1 contient du formaldéhyde. Le formaldéhyde est toxique et allergisant. On pense qu'il s'agit d'un agent cancérigène.
6. Le réactif 2 contient de l'azide de sodium (NaN₃). Il doit être manipulé 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 est susceptible de former un acide hydrazoïque potentiellement dangereux. S'il est nécessaire d'éliminer ce réactif, il est recommandé de le diluer dans un grand volume d'eau avant de le verser dans les canalisations, afin d'éviter l'accumulation d'azoture de sodium dans les conduites métalliques et de prévenir les risques d'explosion.

7. Tous les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés avec soin (en particulier : port de gants, de blouses et de lunettes de protection).
8. Ne jamais pipetter avec la bouche et éviter tout contact des échantillons avec la peau, les muqueuses et les yeux.
9. Les tubes de prélèvement sanguin et les matériaux jetables utilisés pour la manipulation doivent être éliminés dans des conteneurs appropriés prévus pour incinération.
10. Les réactifs et les déchets doivent être éliminés conformément aux exigences locales.

CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Réactif 1 : fixation

DANGER



H302	Nocif en cas d'ingestion.
H313	Peut être nocif par contact cutané
H314	Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.
H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
H341	Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
H350	Peut provoquer le cancer.
H370	Risque avéré d'effets graves pour les organes.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.
P303+P361+P353	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : rincer la peau à l'eau.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P310	EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Méthanol 1 - 2 % Formaldéhyde 5 - 10 %



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

CONSERVATION ET STABILITÉ

IntraPrep se conserve à 18 – 25 °C.

Stabilité du flacon fermé : le réactif est stable pendant 517 jours.

Stabilité du flacon ouvert : le réactif est stable pendant 90 jours.

Voir le certificat d'analyse du lot spécifique sur www.beckman.com.

PREUVE DE DÉTÉRIORATION

Tout changement de l'apparence physique des réactifs peut indiquer une détérioration et le réactif ne doit pas être utilisé.

Pour plus de renseignements ou si un produit défectueux est livré, appeler le service client de Beckman Coulter au 800-742-2345 (USA ou Canada), ou votre représentant de Beckman Coulter local.

CONTENU

Les agents de conservation à base d'azoture de sodium peuvent former des composés explosifs dans les conduites d'évacuation métalliques. Voir le bulletin NIOSH : Explosive Azide Hazard (16/8/76) (Dangers d'explosion de l'azide). 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:

- Les tubes d'échantillonnage et le matériel nécessaires pour l'échantillonnage.
- Pipettes automatiques et embouts jetables pour prélever des quantités de 10, 20, 50, 100 et 500 µL.
- Tubes d'hémolyse en plastique.
- Anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques.
- Contrôles négatifs.
- Réactif de fixation de leucocyte. Par exemple : Solution fixative IOtest 3 (Réf. A07800).
- 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

A - Marquage intracytoplasmique

La quantité de globules rouges présents dans l'échantillon doit être inférieure à 6×10^6 par μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Diluer si nécessaire dans du PBS.

La quantité de leucocytes présents dans l'échantillon doit être inférieure à $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Diluer si nécessaire dans du PBS.

Pour chaque échantillon analysé, en plus du tube de test, un tube de contrôle peut être ajouté dans lequel les cellules sont mélangées en présence du contrôle négatif correspondant à la coloration spécifique choisie.

1. Ajouter 50 µL de l'échantillon de test dans chaque tube.
2. Ajouter 100 µL de réactif 1 dans chaque tube. Vortexer vigoureusement aussitôt après chaque ajout.
3. Incuber 15 minutes à température ambiante (18 – 25 °C).
4. Ajouter 4 mL de PBS dans chaque tube.
5. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes à température ambiante.
6. Retirer le surnageant par aspiration.
7. Ajouter 100 µL de réactif 2 dans chaque tube. NE PAS VORTEXER, laisser le réactif 2 se diffuser naturellement dans le culot cellulaire.
8. Incuber 5 minutes à température ambiante (18 – 25 °C) SANS VORTEXER.
9. Agiter doucement à la main pendant 2 à 3 secondes.
10. Ajouter la quantité nécessaire d'Ac monoclonal (spécifique à un déterminant antigénique intracytoplasmique) dans chaque tube de test et, si nécessaire, ajouter la quantité appropriée de contrôle négatif dans chaque tube de contrôle.
11. Vortexer doucement tube à tube.
12. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante (18–25 °C), à l'abri de la lumière.
13. Ajouter 4 mL de PBS dans chaque tube.
14. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes à température ambiante.
15. Eliminer le surnageant par aspiration et resuspendre le culot cellulaire dans 0,5 mL ou 1 mL de Solution de Fixation IOtest 3 (Réf. A07800) à sa concentration de travail (1X). Ainsi fixées, les préparations se conservent entre 2 et 8 °C et à l'abri de la lumière pendant 24 heures.

B - Marquage intracytoplasmique et membranaire

La quantité de globules rouges présents dans l'échantillon doit être inférieure à 6×10^6 par μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Diluer si nécessaire avec du PBS.

La quantité de leucocytes présents dans l'échantillon doit être inférieure à $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Diluer si nécessaire avec du PBS.

Pour chaque échantillon analysé, en plus du tube de test, un tube de contrôle peut être ajouté dans lequel les cellules sont mélangées en présence du contrôle négatif correspondant à la coloration spécifique choisie.

1. Ajouter 50 µL de l'échantillon de test dans chaque tube.
2. Ajouter la quantité nécessaire d'Ac monoclonal (spécifique à un déterminant antigénique membranaire) dans chaque tube de test et, si nécessaire, ajouter la quantité appropriée de contrôle négatif dans chaque tube de contrôle.
3. Vortexer doucement tube à tube.

4. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante (18–25 °C), à l'abri de la lumière.
5. Ajouter 100 µL de réactif 1 dans chaque tube. Vortexer vigoureusement aussitôt après chaque ajout.
6. Incuber 15 minutes à température ambiante (18 – 25 °C).
7. Ajouter 4 mL de PBS dans chaque tube.
8. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes à température ambiante.
9. Retirer le surnageant par aspiration.
10. Ajouter 100 µL de réactif 2 dans chaque tube. NE PAS VORTEXER, laisser le réactif 2 se diffuser naturellement dans le culot cellulaire.
11. Incuber 5 minutes à température ambiante (18 – 25 °C) SANS VORTEXER.
12. Agiter doucement à la main pendant 2 à 3 secondes.
13. Ajouter la quantité nécessaire d'Ac monoclonal (spécifique à un déterminant antigénique intracytoplasmique) dans chaque tube de test et, si nécessaire, ajouter la quantité appropriée de contrôle négatif dans chaque tube de contrôle.
14. Ajouter dans le tube contrôle 20 µL de contrôle isotypique.
15. Vortexer doucement tube à tube.
16. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante (18–25 °C), à l'abri de la lumière.
17. Ajouter 4 mL de PBS dans chaque tube.
18. Centrifuger à 300 x g pendant 5 minutes à température ambiante.
19. Eliminer le surnageant par aspiration et resuspendre le culot cellulaire dans 0,5 mL ou 1 mL de Solution de Fixation IOtest 3 (Réf. A07800) à sa concentration de travail (1X). Ainsi fixées, les préparations se conservent entre 2 et 8 °C et à l'abri de la lumière pendant 24 heures.

PERFORMANCE

Les données de performance sont obtenues à l'aide de la procédure décrite ci-dessus sur des échantillons de sang de moins de 24 heures préalablement collectés dans des tubes stériles contenant du sel EDTA comme anticoagulant. L'analyse est effectuée dans les 2 heures suivant l'immunocoloration.

PRÉCISION

Les valeurs de percentile positives ont été déterminées à l'aide de sang total et de moelle osseuse. Chaque échantillon a été analysé 4 fois, deux fois par jour pendant 1 jour sur 2 instruments à l'aide de 2 lots de réactif de perméabilisation IntraPrep. Les mesures (% positif) ont été effectuées sur le cytomètre en flux Navios. L'analyse a été effectuée avec la méthode CLSI EP5-A2 : Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Évaluation de la performance de précision des méthodes de mesures quantitatives).

Notre critère d'acceptation est dépendant du nombre d'événements positifs mesurés pour chaque population :

- Si événement positif < 1 500, CV < 15 %
- Si événement positif > 1 500, CV < 10 %

Sang total EDTA :

Coloration membranaire CD45/CD14 = pureté lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 8877							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration membranaire CD45/CD14 = récupération lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 8877							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur monocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 1070							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur granulocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 13246							

	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sang total HÉPARINÉ :

Coloration membranaire CD45/CD14 = pureté lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 6824							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration membranaire CD45/CD14 = récupération lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 6824							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur monocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 961							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur granulocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 20742							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sang total ACD :

Coloration membranaire CD45/CD14 = pureté lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 12355							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration membranaire CD45/CD14 = récupération lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 12355							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur monocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 1483							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur granulocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 32715							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Moelle osseuse EDTA :

Coloration membranaire CD45/CD14 = pureté lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 8808							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration membranaire CD45/CD14 = récupération lymphocytaire							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 8808							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur monocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 2212							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloration intracytoplasmique des anticorps anti-myéloperoxydase (FITC) sur granulocytes							
Nombre d'événements positifs (moyenne) = 33181							
	Inter-opérateur	Inter-cytomètre	Intra-lot	Inter-lot	Inter-analyse	Intra-analyse	Total
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RÉSULTATS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PURETÉ ET RÉCUPÉRATION LYMPHOCYTAIRES

La pureté et la récupération lymphocytaires ont été évaluées selon les recommandations du CDC (5). Le sang de 10 donneurs sains échantillonnés dans l'EDTA, l'héparine et l'ACD et 5 moelles osseuses ont été marqués avec un mélange d'anticorps monoclonaux CD45-FITC et CD14-PE. Les valeurs moyennes de la récupération et de la pureté ainsi que la plage sont présentées dans les tableaux suivants :

Sang total EDTA		
Paramètre	Récupération	Pureté
Moyen	93,6	89,7
Min/Max	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Sang total HÉPARINÉ		
Paramètre	Récupération	Pureté
Moyen	94,3	87,6
Min/Max	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Sang total ACD		
Paramètre	Récupération	Pureté
Moyen	94,2	94,6
Min/Max	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Moelle osseuse EDTA		
Paramètre	Récupération	Pureté
Moyen	80,7	71,8
Min/Max	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

LIMITES

1. La cytométrie en flux peut produire des résultats erronés si le cytomètre n'a pas été parfaitement aligné, si les fuites de fluorescence n'ont pas été correctement compensées et si les régions n'ont pas été soigneusement positionnées.
2. Certains déterminants antigéniques peuvent être sensibles au formaldéhyde ou à la saponine. Chaque laboratoire doit valider les conditions d'utilisation des AcM.
3. Des résultats précis et reproductibles seront obtenus tant que les procédures utilisées sont en conformité avec la notice technique et compatibles avec les bonnes pratiques de laboratoire.
4. Ce réactif a été optimisé de manière à offrir le meilleur rapport signal spécifique / signal non spécifique. De ce fait, il est important de respecter le rapport volume de réactif / nombre de leucocytes et d'érythrocytes pour chaque test.
5. En cas d'hypercellularité, diluer le spécimen dans du PBS de façon à obtenir moins de 5×10^9 leucocytes / L et moins de 6×10^{12} globules rouges / L (6).
6. Dans certains états pathologiques, tels qu'une grave insuffisance rénale ou une hémoglobinopathie, la lyse des globules rouges peut être lente, incomplète ou même impossible. Dans ce cas, il est recommandé d'isoler les cellules mononucléées à l'aide d'un gradient de densité (Ficoll, par exemple) avant la coloration (7).

Voir l'annexe pour des exemples et des références.

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.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

Pour un patient/utilisateur/tiers de l'Union européenne et des pays ayant le même régime réglementaire (Règlement 2017/746/UE relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) ; si, lors de l'utilisation de ce dispositif ou suite à son utilisation, un incident important se produit, veuillez le rapporter au fabricant et/ou à son représentant autorisé et à l'autorité nationale de votre pays.

HISTORIQUE DES RÉVISIONS

RÉVISION AF :	Date de publication : Janvier 2021
RÉVISION AW :	
Mises à jour pour se conformer aux exigences de la politique d'étiquetage générale de Beckman Coulter et aux exigences IVD-R (UE)2017/746 :	
Ajout de sections	Utilisateur auquel le dispositif est destiné, Précision, Récupération lymphocytaire et Pureté, Informations supplémentaires, Historique des révisions
Ajout d'informations	Voir les sections Avertissements et précautions, Conservation et stabilité, Limites
Sections mises à jour	Avertissements et précautions, Classification des risques SGH, Conservation et stabilité, Preuve de détérioration, Procédure, Performances
Suppression de sections	Reproductibilité intra-laboratoire

Légende des symboles

Un glossaire des symboles est disponible sur beckmancoulter.com/techdocs (document numéro B60062)

	Reagenz 1	Reagenz 2
	Fixierung	Permeabilisierung
Form	Flüssig	Flüssig
Wirkstoff	Formaldehyd	Saponin
Band	5 mL	5 mL
Anzahl der Fläschchen	3 Fläschchen	3 Fläschchen
Menge je Test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 Tests ; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / Test

Zur Verwendung als *In vitro*-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

IntraPrep umfasst zwei gebrauchsfertige Reagenzien, mit denen zum Nachweis von intrazellulären Antigen determinanten mittels fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern die zytoplasmatische Membran der Leukozyten permeabilisiert werden kann. IntraPrep wird zur Vorbereitung von biologischen Proben verwendet, die zur Analyse im Durchflusszytometer bestimmt sind. Es wurde optimiert, um bei dieser Art von Analyse die unspezifischen Markierungen zu reduzieren (1,2,3,4).

PRINZIP

Zunächst werden mit dem Reagenz 1 die Zellen fixiert. Nach dem Waschen werden sie mit dem Reagenz 2 permeabilisiert und den vorhandenen Erythrozyten lysiert. Bei diesem Schritt werden die Zellen mit den konjugierten monoklonalen Antikörpern, die für die intrazellulären Antigen determinanten spezifisch sind in Kontakt gebracht. Danach werden der Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert.

Der Nachweis von oberflächlichen Antigen determinanten bleibt jedoch möglich. In diesem Fall werden die spezifischen konjugierten monoklonalen Antikörper vor dem Fixieren inkubiert.

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 Gating anwendbar.

Die Fluoreszenz der einzelnen Zellen wird analysiert, um die positiv angefärbten Ereignisse von den nicht angefärbten zu unterscheiden. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz positiver Ereignisse relativ zu allen durch das Gating erfassten Ereignissen angegeben.

VORGESEHENER BENUTZER

Dieses Produkt ist für den Einsatz durch Laborfachkräfte vorgesehen.

PROBEN

Die Blutabnahmen von venösem Blut bzw. die Knochenmarkpunktionen müssen mit sterilen Röhrchen vorgenommen werden, die ein EDTA-Salz, ACD oder Heparin als Antikoagulant 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 analysiert werden.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Das Reagenz nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
2. Nicht einfrieren.
3. Vor Licht schützen.
4. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, damit kein falsches Ergebnis erzielt wird.
5. Reagenz 1 enthält Formaldehyd. Formaldehyd ist toxisch und allergieauslösend. Es gilt als krebserregender Stoff.
6. Das Reagenz 2 enthält Natriumazid (NaN₃) und muss mit Vorsicht behandelt werden. Verschlucken und jeglicher Kontakt mit der Haut, den Schleimhäuten und den Augen ist zu vermeiden. Zudem kann Natriumazid in einem sauren Medium potentiell gefährliches Azoimid bilden. Zur Entsorgung wird empfohlen, dieses 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. Blutproben sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen mit Vorsicht gehandhabt werden (insbesondere durch Tragen von Schutzhandschuhen, -kittel und -brille).
8. Niemals mit dem Mund pipettieren und jeglichen Kontakt der Proben mit Haut, Schleimhaut und Augen vermeiden.
9. Blutröhrchen und Einwegmaterial, das zur Handhabung verwendet wird, müssen in dafür vorgesehenen, für die Verbrennung bestimmten Behältern entsorgt werden.
10. Reagenzien und Abfälle sind entsprechend den örtlichen Anforderungen zu entsorgen.

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Reagenz 1: Fixierung

GEFAHR



H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H313	Kann bei Berührung mit der Haut gesundheitsschädlich sein.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H370	Schädigt die Organe.
P201	Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P280	Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P303+P361+P353	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Haut mit Wasser abwaschen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P310	Sofort GIFTNOTRUFZENTRALE oder Arzt anrufen. Methanol 1 - 2 % Formaldehyd 5 - 10 %



Das Sicherheitsdatenblatt ist auf beckman.com/techdocs verfügbar.

LAGERUNG UND STABILITÄT

IntraPrep ist bei 18-25 °C aufzubewahren.

Stabilität geschlossener Fläschchen: Das Reagenz ist 517 Tage lang stabil.

Stabilität geöffneter Fläschchen: Das Reagenz ist 90 Tage lang stabil.

Siehe das chargenspezifische Analysezertifikat unter www.beckman.com.

VERFALLSANZEICHEN

Ein verändertes Aussehen der Reagenzien kann ein Verfallsanzeichen sein. Entsprechende Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.

Wenn Sie weitere Informationen wünschen oder falls das Produkt beschädigt bei Ihnen eintrifft, setzen Sie sich (innerhalb der USA und Kanada) unter der Rufnummer 800-742-2345 mit dem Kundendienst von Beckman Coulter bzw. außerhalb dieser Länder mit dem für Sie zuständigen Beckman Coulter-Mitarbeiter in Verbindung.

INHALT

Natriumazid als Konservierungsmittel kann in metallischen Abflussleitungen explosive Verbindungen bilden. Siehe NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (16.8.76) (NIOSH-Bulletin: Gefahr durch explosive Azide).

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

BENÖTIGTE, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENE ARTIKEL:

- Probenahmeröhrchen und für die Probenahme benötigte Materialien.
- Automatische Pipetten und Einweghülsen zur Entnahme folgender Mengen: 10, 20, 50, 100 und 500 µL.
- Hämolyseröhrchen aus Kunststoff.
- Spezifische monoklonale Antikörper (mAK).
- Negativkontrollen.
- Reagenz zur Leukozytenfixierung. Beispiel: IOTest 3-Fixierungslösung (Ref. A07800).
- Puffer (PBS: 0,01 M Natriumphosphat; 0,145 M Natriumchlorid; pH 7,2).
- Zentrifuge.
- Automatisches Mischgerät (Typ Vortex-Mischer).
- Durchflussszytometer.

VERFAHREN

Intrazytoplasmatisches Markieren

Die in der Probe vorhandene Menge roter Blutkörperchen muss unter 6×10^6 /µL liegen (6×10^{12} /L). Bei Bedarf in PBS verdünnen.

Die Leukozytenkonzentration in der Probe muss unter 5×10^3 /µL (5×10^9 /L) liegen. Bei Bedarf in PBS verdünnen.

Für jede analysierte Probe kann zusätzlich zum Teströhrchen noch ein Kontrollröhrchen verwendet werden, in dem die Zellen in Gegenwart der negativen Kontrolle für die jeweils gewählte Färbung gemischt werden.

1. 50 µL der Testprobe in jedes Röhrchen geben.
2. 100 µL von Reagenz 1 in jedes Röhrchen geben. Unmittelbar nach jeder Hinzufügung kräftig mittels Vortex-Mischer mischen.
3. 15 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) inkubieren.
4. In jedes Röhrchen 4 mL PBS geben.
5. 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugieren.
6. Den Überstand absaugen.
7. 100 µL von Reagenz 2 in jedes Röhrchen geben. NICHT MITTELS VORTEX-MISCHER MISCHEN. Reagenz 2 auf natürliche Weise in das Zellpellet diffundieren lassen.
8. 5 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) und OHNE SCHÜTTELN inkubieren.
9. Mit der Hand 2 bis 3 Sekunden leicht schütteln.
10. Jedem Teströhrchen die geforderte Menge des mAK (spezifisch für eine intrazytoplasmatische antigene Determinante) begeben. Bei Bedarf auch jedem Kontrollröhrchen die entsprechende Menge der negativen Kontrolle hinzufügen.
11. Die Röhrchen nacheinander leicht rütteln.
12. Bei Raumtemperatur (18–25 °C) 15 Minuten lang lichtgeschützt inkubieren.
13. In jedes Röhrchen 4 mL PBS geben.
14. 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugieren.
15. Überstände durch Absaugen entfernen und Zellpellet in 0,5 mL oder 1 mL IOTest 3 Fixationslösung (Art. A07800) in deren Arbeitskonzentration (1X) resuspendieren. Die so fixierten Proben können zwischen 2 und 8 °C und vor Lichteinstrahlung geschützt 24 Stunden lang aufbewahrt werden.

B - Intrazytoplasmatisches und membranäres Markieren

Die in der Probe vorhandene Menge roter Blutkörperchen muss unter 6×10^6 pro µL liegen (6×10^{12} /L). Bei Bedarf mit PBS verdünnen.

Die Leukozytenkonzentration in der Probe muss unter 5×10^3 /µL (5×10^9 /L) liegen. Bei Bedarf mit PBS verdünnen.

Für jede analysierte Probe kann zusätzlich zum Teströhrchen noch ein Kontrollröhrchen verwendet werden, in dem die Zellen in Gegenwart der negativen Kontrolle für die jeweils gewählte Färbung gemischt werden.

1. 50 µL der Testprobe in jedes Röhrchen geben.

2. Jedem Teströhrchen die geforderte Menge des mAK (spezifisch für eine membranöse antigene Determinante) begeben. Bei Bedarf auch jedem Kontrollröhrchen die entsprechende Menge der negativen Kontrolle hinzufügen.
3. Die Röhrchen nacheinander leicht rütteln.
4. Bei Raumtemperatur (18–25 °C) 15 Minuten lang lichtgeschützt inkubieren.
5. 100 µL von Reagenz 1 in jedes Röhrchen geben. Unmittelbar nach jeder Hinzufügung kräftig mittels Vortex-Mischer mischen.
6. 15 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) inkubieren.
7. In jedes Röhrchen 4 mL PBS geben.
8. 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugieren.
9. Den Überstand absaugen.
10. 100 µL von Reagenz 2 in jedes Röhrchen geben. NICHT MITTELS VORTEX-MISCHER MISCHEN. Reagenz 2 auf natürliche Weise in das Zellpellet diffundieren lassen.
11. 5 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) und OHNE SCHÜTTELN inkubieren.
12. Mit der Hand 2 bis 3 Sekunden leicht schütteln.
13. Jedem Teströhrchen die geforderte Menge des mAK (spezifisch für eine intrazytoplasmatische antigene Determinante) begeben. Bei Bedarf auch jedem Kontrollröhrchen die entsprechende Menge der negativen Kontrolle hinzufügen.
14. In das Kontrollröhrchen 20 µL Isotypiekontrolle geben.
15. Die Röhrchen nacheinander leicht rütteln.
16. Bei Raumtemperatur (18–25 °C) 15 Minuten lang lichtgeschützt inkubieren.
17. In jedes Röhrchen 4 mL PBS geben.
18. 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugieren.
19. Überstände durch Absaugen entfernen und Zellpellet in 0,5 mL oder 1 mL IOTest 3 Fixationslösung (Art. A07800) in deren Arbeitskonzentration (1X) resuspendieren. Die so fixierten Proben können zwischen 2 und 8 °C und vor Lichteinstrahlung geschützt 24 Stunden lang aufbewahrt werden.

LEISTUNG

Leistungsdaten werden unter Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens mit weniger als 24 Stunden alten Blutproben ermittelt, die zuvor in sterile Röhrchen mit EDTA-Salz als Antikoagulant entnommen wurden. Die Analyse erfolgt innerhalb von 2 Stunden nach der Immunfärbung.

PRÄZISION

Die prozentualen positiven Werte wurden unter Verwendung von Vollblut und Knochenmark bestimmt. Jede Probe wurde zweimal täglich 1 Tag lang unter Verwendung von 2 Chargen des IntraPrep-Permeabilisierungsreagenzes 4 Mal auf 2 Instrumenten analysiert. Messungen (% positiv) wurden mit dem Navios-Durchflusszytometer vorgenommen. Die Analyse erfolgte gemäß CLSI-Methode EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Beurteilung der Präzisionsleistung von quantitativen Messmethoden).

Unsere Akzeptanzkriterien sind abhängig von der Anzahl an positiven Ereignissen, die für jede Population gemessen werden:

- Wenn positives Ereignis < 1 500, VK < 15 %
- Wenn positives Ereignis > 1 500, VK < 10 %

In EDTA entnommenes Vollblut:

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Reinheit							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 8877							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Wiederfindung							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 8877							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Monozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 1070							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Granulozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 13246							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

In HEPARIN entnommenes Vollblut:

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Reinheit							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 6824							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Wiederfindung							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 6824							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Monozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 961							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Granulozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 20742							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

In ACD entnommenes Vollblut:

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Reinheit							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 12355							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Wiederfindung							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 12355							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Monozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 1483							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Granulozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 32715							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

In EDTA entnommenes Knochenmark:

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Reinheit							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 8808							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membranöse CD45/CD14-Färbung = lymphozytäre Wiederfindung							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 8808							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Monozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 2212							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intrazytoplasmatische Anti-Myeloperoxidase-FITC-Färbung auf Granulozyten							
Anzahl der positiven Ereignisse (Mittelwert) = 33181							
	Zwischen Bedienern	Zwischen Durchflusszytometern	Innerhalb einer Charge	Zwischen Chargen	Zwischen Läufen	Innerhalb eines Laufs	Gesamt
VK (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
ERGEBNISSE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LYMPHOZYTÄRE REINHEIT UND WIEDERFINDUNG

Lymphozytäre Reinheit und Wiederfindung wurden gemäß den Empfehlungen der CDC (5) beurteilt. Das in EDTA, Heparin und ACD entnommene Blut von 10 gesunden Spendern sowie 5 Knochenmarkproben wurden mit einem Gemisch aus den monoklonalen Antikörpern CD45-FITC und CD14-PE markiert. Die Mittelwerte für Wiederfindung und Reinheit sowie der Bereich sind in den nachstehenden Tabellen aufgeführt:

In EDTA entnommenes Vollblut		
Parameter	Wiederfindung	Reinheit
Durchschnitt	93,6	89,7
Min./Max.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

In HEPARIN entnommenes Vollblut		
Parameter	Wiederfindung	Reinheit
Durchschnitt	94,3	87,6
Min./Max.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

In ACD entnommenes Vollblut		
Parameter	Wiederfindung	Reinheit
Durchschnitt	94,2	94,6
Min./Max.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

In EDTA entnommenes Knochenmark		
Parameter	Wiederfindung	Reinheit
Durchschnitt	80,7	71,8
Min./Max.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Durchflusszytometrie kann falsche Ergebnisse liefern, wenn das Zytometer nicht perfekt ausgerichtet wurde, wenn Fluoreszenzlecks nicht korrekt kompensiert wurden und wenn die Bereiche nicht sorgfältig positioniert wurden.
2. Bestimmte Antigendeterminanten können gegenüber Formaldehyd oder Saponin empfindlich sein. Jedes Labor muss die Anwendungsbedingungen der monoklonale Antikörper freigeben.
3. Genaue und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, sofern die verwendeten Verfahren der technischen Packungsbeilage entsprechen und mit der guten Laborpraxis kompatibel sind.
4. Dieses Reagenz wurde so optimiert, dass das beste Verhältnis zwischen spezifischem und unspezifischem Signal erzielt wird. Deshalb ist es wichtig, das Verhältnis zwischen Reagenzmenge / Leukozyten- und Erythrozytenanzahl bei jedem Test einzuhalten.
5. Bei einer zu hohen Zellzahl die Probe in PBS verdünnen, so dass man unter 5×10^9 Leukozyten/L und unter 6×10^{12} Erythrozyten/L erhält (6).
6. Bei bestimmten Krankheitszuständen, beispielsweise einem schweren Nierenversagen oder Hämoglobinopathien, kann die Lyse der Erythrozyten möglicherweise nur langsam oder unvollständig erfolgen oder sogar unmöglich sein. In diesem Fall empfiehlt es sich, vor dem Färben einkernige Zellen mittels eines Dichtegradienten (beispielsweise Ficoll) zu isolieren (7).

Beispiele und Literaturhinweise siehe Anhang.

MARKEN

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

WEITERE INFORMATIONEN

Für einen Patienten/Benutzer/Dritten in der Europäischen Union und in Ländern mit identischer Regulierungspraxis (Verordnung 2017/746/EU über In-vitro-Diagnostika) gilt Folgendes: Sollte es im Rahmen der Verwendung dieses Produktes oder infolge der Verwendung dieses Produktes zu einem schwerwiegenden Zwischenfall gekommen sein, ist dieser dem Hersteller und/oder dessen Bevollmächtigten sowie der nationalen Behörde zu melden.

REVISIONSVERLAUF

REVISION AF:	Freigabedatum: Januar 2021
REVISION AW:	
Aktualisierungen vorgenommen, um den Vorgaben der globalen Etikettierungsrichtlinie von Beckman Coulter und den Vorgaben nach IVD-R (EU) 2017/746 zu entsprechen:	
Abschnitte hinzugefügt	Vorgesehener Benutzer, Präzision, Lymphozytäre Wiederfindung und Reinheit, Weitere Informationen, Revisionsverlauf
Informationen hinzugefügt	Siehe Abschnitte Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen, Lagerung und Stabilität, Einschränkungen
Aktualisierte Abschnitte	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen, GHS-Gefahrstoffklassifizierung, Lagerung und Stabilität, Verfallsanzeichen, Verfahren, Leistung
Abschnitte gestrichen	Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors

Liste der Symbole

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

	Reagente 1	Reagente 2
	Fissante	Permeabilizzante
Forma	Liquido	Liquido
Principio attivo	Formaldeide	Saponina
Volume	5 mL	5 mL
Numero di flaconi	3 flaconi	3 flaconi
Volume per provetta	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 test; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / test

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

IntraPrep comprende due reagenti pronti all'uso che consentono di permeabilizzare la membrana citoplasmatica dei leucociti al fine di marcare determinanti antigenici intracellulari mediante anticorpi monoclonali fluorescenti. IntraPrep si utilizza per preparare campioni biologici destinati ad essere analizzati in citometria a flusso. Questo reagente è stato ottimizzato per ridurre al minimo le marcature aspecifiche in questo tipo di analisi (1,2,3,4).

PRINCIPIO

In un primo tempo le cellule sono fissate con il reagente 1. Dopo il lavaggio, esse sono permeabilizzate con il reagente 2 e gli eritrociti sono lisati. Durante questa fase, le cellule sono messe in contatto con gli anticorpi monoclonali coniugati, specifici per i determinanti antigenici intracellulari. Successivamente gli leucociti vengono analizzati in citometria a flusso.

È inoltre possibile segnalare la presenza dei determinanti antigenici di superficie. In questo caso, gli anticorpi monoclonali coniugati specifici vengono incubati prima della fase di fissaggio.

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 delimitate viene analizzata per distinguere gli eventi colorati in modo positivo e quelli non colorati. I risultati sono espressi come percentuale di eventi positivi in relazione a tutti gli eventi acquisiti mediante determinazione del gate.

UTENTE PREVISTO

Questo prodotto è destinato all'uso professionale in laboratorio.

CAMPIONI

I campioni di sangue venoso o midollo osseo devono essere prelevati utilizzando provette sterili contenenti EDTA, ACD o eparina 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 dalla venipuntura.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza.
2. Non congelare.
3. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce.
4. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché potrebbe falsare i risultati.
5. Il reagente 1 contiene formaldeide. La formaldeide è tossica e allergenica. Si pensa che sia un agente cancerogeno.
6. Il reagente 2 contiene sodio azide (NaN₃). Manipolare con cura. Non ingerire ed evitare il contatto con la pelle, le mucose e gli occhi. Inoltre, ricordare che, in ambienti acidi, il sodio azide può formare un acido idrazoico potenzialmente pericoloso. Qualora fosse necessario provvedere allo smaltimento di questo reagente, si raccomanda di diluirlo in un grande volume di acqua prima di versarlo nelle tubazioni, in modo da evitare l'accumulo di sodio azide nei condotti metallici e prevenire rischi di esplosione.
7. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente infetti e devono essere maneggiati con cura (in particolare, indossando guanti, camici e occhiali protettivi).

8. Non pipettare mai usando la bocca ed evitare il contatto dei campioni con la pelle, le mucose e gli occhi.
9. Le provette per il sangue e i materiali monouso usati per la manipolazione devono essere smaltiti in appositi contenitori destinati all'inceneritore.
10. I reagenti e i rifiuti devono essere smaltiti conformemente alla normative locali.

CLASSIFICAZIONE DEI PERICOLI GHS

Reattivo 1: Fissazione

PERICOLO



H302	Nocivo se ingerito.
H313	Può essere nocivo a contatto con la pelle.
H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
H341	Sospettato di provocare alterazioni genetiche.
H350	Può provocare il cancro.
H370	Provoca danni agli organi.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): lavare abbondantemente con acqua.
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Metanolo 1 - 2% Formaldeide 5 - 10%



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

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il reagente IntraPrep deve essere conservato a una temperatura compresa tra i 18 e i 25° C.

Stabilità di una fiala chiusa: il reagente è stabile per 517 giorni.

Stabilità di una fiala aperta: il reagente è stabile per 90 giorni.

Vedere il Certificato di analisi specifico del lotto sul sito www.beckman.com.

INDICI DI DETERIORAMENTO

Qualsiasi cambiamento dell'aspetto fisico dei reagenti può indicare un deterioramento. In tale caso, non utilizzare il reagente.

Per ulteriori informazioni, o nel caso in cui il prodotto ricevuto risulti danneggiato, rivolgersi all'assistenza clienti Beckman Coulter al numero 800-742-2345 (USA o Canada) o mettersi in contatto con il rappresentante locale Beckman Coulter.

SOMMARIO

Il conservante sodio azide può formare composti esplosivi nelle tubazioni metalliche di scarico. Vedere il bollettino NIOSH: Explosive Azide Hazard (16/8/76) (Bollettino dell'Istituto Nazionale per la Sicurezza e la Salute sul Lavoro: Rischio di esplosione del sodio azide).

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 eliminato conformemente alle normative locali applicabili.

COMPONENTI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT:

- Provette per campioni e materiale necessario per il campionamento.
- Pipette automatiche e puntali usa e getta destinati a prelevare quantità di 10, 20, 50, 100 e 500 µL.
- Provette per emolisi in plastica.
- Anticorpi monoclonali (MoAb) specifici.
- Controlli negativi.
- Reagente di fissaggio dei leucociti. Ad esempio: Soluzione fissante IOTest 3 (Rif. A07800).
- Tampone (PBS: 0,01 M di fosfato di sodio, 0,145 M di cloruro di sodio, pH 7,2).
- Centrifugare.
- Agitatore automatico (tipo Vortex).
- Citometro a flusso.

PROCEDURA

A - Marcatura intracitoplasmatica

La quantità di globuli rossi presenti nel campione deve essere inferiore a 6×10^6 per µL (6×10^{12} /L). Se necessario, diluire con PBS.

La quantità di leucociti presenti nel campione deve essere inferiore a 5×10^3 per µL (5×10^9 /L). Se necessario, diluire con PBS.

Per ogni campione analizzato, oltre alla provetta del test, si può aggiungere una provetta di controllo in cui miscelare le cellule con il controllo negativo corrispondente alla colorazione specifica prescelta.

1. Aggiungere 50 µL di campione del test in ogni provetta.
2. Aggiungere 100 µL di reagente 1 in ogni provetta. Agitare vigorosamente con Vortex subito dopo ogni aggiunta.
3. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C).
4. Aggiungere 4 mL di PBS a ciascuna provetta.
5. Centrifugare per 5 minuti a 300 x g e a temperatura ambiente.
6. Rimuovere il surnatante mediante aspirazione.
7. Aggiungere 100 µL del reagente 2 in ogni provetta. NON AGITARE CON VORTEX, lasciare che il reagente 2 si diffonda naturalmente nel pellet di cellule.
8. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C) SENZA AGITARE AL VORTEX.
9. Agitare delicatamente a mano per 2 - 3 secondi.
10. Aggiungere la quantità necessaria di mAb (specifica per un determinante antigenico intracitoplasmatico) a ciascuna provetta del test e, se necessario, la quantità appropriata di controllo negativo a ciascuna provetta di controllo.
11. Vortexare delicatamente provetta dopo provetta.
12. Incubare a temperatura ambiente (18-25 °C) per 15 minuti, al riparo dalla luce.
13. Aggiungere 4 mL di PBS a ciascuna provetta.
14. Centrifugare per 5 minuti a 300 x g e a temperatura ambiente.
15. Eliminare il surnatante tramite aspirazione e riportare in sospensione il pellet cellulare in 0,5 mL o 1 mL di Soluzione Fissante IOTest 3 (Rif. A07800) alla sua concentrazione di lavoro (1X). Con un tale fissaggio, i preparati devono essere conservati a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce per 24 ore.

B - Marcatura intracitoplasmatica e di membrana

La quantità di globuli rossi presenti nel campione deve essere inferiore a 6×10^6 per µL (6×10^{12} /L). Se necessario, diluire con PBS.

La quantità di leucociti presenti nel campione deve essere inferiore a 5×10^3 per µL (5×10^9 /L). Se necessario, diluire con PBS.

Per ogni campione analizzato, oltre alla provetta del test, si può aggiungere una provetta di controllo in cui miscelare le cellule con il controllo negativo corrispondente alla colorazione specifica prescelta.

1. Aggiungere 50 µL di campione del test in ogni provetta.
2. Aggiungere la quantità necessaria di mAb (specifica per un determinante antigenico membranoso) a ciascuna provetta del test e, se necessario, aggiungere la quantità appropriata di controllo negativo a ciascuna provetta di controllo.
3. Vortexare delicatamente provetta dopo provetta.
4. Incubare a temperatura ambiente (18-25 °C) per 15 minuti, al riparo dalla luce.

5. Aggiungere 100 µL di reagente 1 in ogni provetta. Agitare vigorosamente con Vortex subito dopo ogni aggiunta.
6. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C).
7. Aggiungere 4 mL di PBS a ciascuna provetta.
8. Centrifugare per 5 minuti a 300 x g e a temperatura ambiente.
9. Rimuovere il surnatante mediante aspirazione.
10. Aggiungere 100 µL del reagente 2 in ogni provetta. NON AGITARE CON VORTEX, lasciare che il reagente 2 si diffonda naturalmente nel pellet di cellule.
11. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C) SENZA AGITARE AL VORTEX.
12. Agitare delicatamente a mano per 2 - 3 secondi.
13. Aggiungere la quantità necessaria di mAb (specifica per un determinante antigenico intracitoplasmatico) a ciascuna provetta del test e, se necessario, la quantità appropriata di controllo negativo a ciascuna provetta di controllo.
14. Nella provetta di controllo, aggiungere 20 µL di controllo isotipico.
15. Vortexare delicatamente provetta dopo provetta.
16. Incubare a temperatura ambiente (18-25 °C) per 15 minuti, al riparo dalla luce.
17. Aggiungere 4 mL di PBS a ciascuna provetta.
18. Centrifugare per 5 minuti a 300 x g e a temperatura ambiente.
19. Eliminare il surnatante tramite aspirazione e riportare in sospensione il pellet cellulare in 0,5 mL o 1 mL di Soluzione Fissante IOTest 3 (Rif. A07800) alla sua concentrazione di lavoro (1X). Con un tale fissaggio, i preparati devono essere conservati a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce per 24 ore.

PRESTAZIONI

I dati delle prestazioni si ottengono adottando la procedura descritta in precedenza su campioni di sangue raccolti da meno di 24 ore in provette sterili con anticoagulante EDTA. L'analisi viene eseguita entro 2 ore dall'immunocolorazione.

PRECISIONE

I valori percentuali positivi sono stati determinati utilizzando sangue intero e midollo osseo. Ogni campione è stato analizzato 4 volte, due volte al giorno per 1 giorno su 2 strumenti utilizzando 2 lotti di reagente di permeabilizzazione IntraPrep. Le misurazioni (% di positivi) sono state effettuate su un citometro a flusso Navios. L'analisi è stata condotta secondo il metodo EP5-A2 del CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Valutazione delle prestazioni di precisione dei metodi di misurazione quantitativa).

I nostri criteri di accettazione dipendono dal numero di eventi positivi misurati per ogni popolazione:

- Se evento positivo < 1.500, CV < 15%
- Se evento positivo > 1.500, CV < 10%

Sangue intero EDTA:

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Purezza dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 8877							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Valore di recupero dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 8877							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su monociti							
Numero di eventi positivi (media) = 1070							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su granulociti							
Numero di eventi positivi (media) = 13246							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sangue intero EPARINA:

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Purezza dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 6824							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Valore di recupero dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 6824							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su monociti							
Numero di eventi positivi (media) = 961							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su granulociti							
Numero di eventi positivi (media) = 20742							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sangue intero ACD:

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Purezza dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 12355							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Valore di recupero dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 12355							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su monociti							
Numero di eventi positivi (media) = 1483							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su granulociti							
Numero di eventi positivi (media) = 32715							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Midollo osseo EDTA:

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Purezza dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 8808							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione membranosa CD45/CD14 = Valore di recupero dei linfociti							
Numero di eventi positivi (media) = 8808							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su monociti							
Numero di eventi positivi (media) = 2212							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorazione intracitoplasmatica anti-mieloperossidasi-FITC su granulociti							
Numero di eventi positivi (media) = 33181							
	Inter-operatore	Inter-citometro	Intra-lotto	Inter-lotto	Inter-analisi	Intra-analisi	Totale
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RISULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PUREZZA E VALORE DI RECUPERO DEI LINFOCITI

La purezza e il valore di recupero dei linfociti sono stati valutati secondo le raccomandazioni del CDC (5). Il sangue di 10 donatori sani in campioni con EDTA, eparina e ACD e 5 midolli ossei sono stati marcati con una miscela di anticorpi monoclonali CD45-FITC e CD14-PE. Nelle tabelle seguenti sono riportati i valori medi del valore di recupero e della purezza, oltre all'intervallo:

Sangue intero EDTA		
Parametro	Valore di recupero	Purezza
Media	93,6	89,7
Min/Max	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Sangue intero EPARINA		
Parametro	Valore di recupero	Purezza
Media	94,3	87,6
Min/Max	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Sangue intero ACD		
Parametro	Valore di recupero	Purezza
Media	94,2	94,6
Min/Max	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Midollo osseo EDTA		
Parametro	Valore di recupero	Purezza
Media	80,7	71,8
Min/Max	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

LIMITAZIONI

1. La citometria a flusso può produrre falsi risultati se il citometro non viene allineato perfettamente, le perdite di fluorescenza non vengono correttamente compensate e le regioni non vengono posizionate attentamente.
2. Alcuni determinanti antigenici possono essere sensibili alla formaldeide o alla saponina. Ogni laboratorio deve confermare le condizioni di utilizzo degli anticorpi monoclonali.
3. Seguendo le procedure descritte nel foglietto illustrativo con le informazioni tecniche, compatibili con le buone pratiche di laboratorio, è possibile ottenere risultati accurati e riproducibili.
4. Questo reagente è ottimizzato in modo tale da offrire il miglior rapporto possibile in termini di segnale specifico / segnale non specifico. È quindi importante rispettare il rapporto volume di reagente / numero di leucociti e d'eritrociti per ogni test.
5. In caso di iperleucocitosi, diluire il campione con PBS fino a ottenere un valore inferiore a 5×10^9 leucociti/L e inferiore a 6×10^{12} globuli rossi /L (6).
6. In alcuni stati patologici, come insufficienza renale grave o emoglobinopatie, la lisi degli eritrociti può risultare lenta, incompleta o persino impossibile. In questo caso, è consigliabile isolare le cellule mononucleate usando un gradiente di densità (ad esempio, Ficoll) prima della colorazione (7).

Per esempi e riferimenti, vedere l'appendice.

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.

INFORMAZIONI AGGIUNTIVE

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e in paesi con identico regime normativo (Regolamento 2017/746/UE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro): se, durante l'utilizzo di questo dispositivo o in seguito al suo utilizzo, si fosse verificato un incidente grave, si prega di segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità nazionale competente.

CRONOLOGIA REVISIONI

REVISIONE AF:	Data di pubblicazione: gennaio 2021
---------------	-------------------------------------

REVISIONE AW:	
Aggiornamenti conformi alla politica sull'etichettatura globale di Beckman Coulter e ai requisiti IVD-R (UE)2017/746:	
Sezioni aggiunte	Utilizzatore previsto, Precisione, Valore di recupero e purezza dei linfociti, Informazioni aggiuntive, Cronologia revisioni
Aggiunta di informazioni	Vedere le sezioni Avvertenze e precauzioni, Conservazione e stabilità, Limiti
Sezioni aggiornate	Avvertenze e precauzioni, Classificazione pericoli GHS, Conservazione e stabilità, Segni di deterioramento, Procedura, Prestazioni
Sezioni rimosse	Riproducibilità intralaboratorio

Legenda dei simboli

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

	Reactivo 1	Reactivo 2
	Fijador	Permeabilizante
Forma	Líquido	Líquido
Principio activo	Formaldehído	Saponina
Volumen	5 mL	5 mL
Número de frascos	3 frascos	3 frascos
Volumen por determinación	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 determinaciones; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / determinación

Para uso diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

IntraPrep comprende dos reactivos listos para su empleo que permiten permeabilizar la membrana citoplasmática de los leucocitos para el evidenciado, por medio de anticuerpos monoclonales fluorescentes, de determinantes antigénicos intracelulares. IntraPrep se utiliza para preparar muestras biológicas destinadas a analizarse por citometría de flujo. Se ha optimizado para minimizar los marcajes inespecíficos en este tipo de análisis (1,2,3,4).

PRINCIPIO

Las células se fijan inicialmente con el reactivo 1. Después del lavado, se permeabilizan con el reactivo 2 y se lisan los eritrocitos presentes. Durante esta etapa, las células se ponen en contacto con los anticuerpos monoclonales conjugados, específicos de determinantes antigénicos intracelulares. Después, los leucocitos se analizan por citometría de flujo.

No obstante, sigue siendo posible el evidenciado de determinantes antigénicos de superficie. En este caso, los anticuerpos monoclonales conjugados específicos se incuban antes de la fijación.

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 acotadas se analiza para distinguir los eventos con tinción positiva de los eventos sin teñir. Los resultados se expresan como un porcentaje de eventos positivos en relación con todos los eventos adquiridos mediante la selección.

USUARIO PREVISTO

Este producto está diseñado para su uso en un laboratorio profesional.

MUESTRAS

Las muestras de sangre venosa o de médula ósea deben recogerse en tubos de muestra estériles que contengan una sal de EDTA, ACD o heparina como anticoagulantes.

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

Las muestras deben analizarse en el plazo de 24 horas tras la venopunción.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. No use el reactivo después de la fecha de caducidad.
2. No lo congele.
3. Minimice el tiempo de exposición a la luz.
4. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, ya que esto puede provocar resultados falsos.
5. El reactivo 1 contiene formaldehído. El formaldehído es tóxico y alergénico. Se cree que es un agente cancerígeno.
6. El reactivo 2 contiene azida sódica (NaN₃). Debe manipularse con precaución. No ingerir y evitar todo contacto con la piel, las mucosas y los ojos. Por otra parte, en medio ácido, la azida sódica puede formar un ácido hidrazoico potencialmente peligroso. Si fuera 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 los sistemas metálicos de conducción y los riesgos de explosión.

7. Todas las muestras sanguíneas deben considerarse posiblemente infecciosas y deben manipularse con cuidado (en especial, hay que llevar guantes, bata y gafas de protección).
8. No pipetee nunca con la boca y evite todo contacto de las muestras con la piel, las mucosas y los ojos.
9. Los tubos para sangre y el material desechable utilizados para la manipulación deben eliminarse en recipientes especiales previstos para la incineración.
10. Los reactivos y los desechos deben eliminarse de acuerdo con los requisitos locales.

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

Reactivo 1: Fijación

PELIGRO



H302	Nocivo en caso de ingestión.
H313	Puede ser nocivo en contacto con la piel.
H314	Provoca graves quemaduras en la piel y lesiones oculares.
H317	Puede provocar una reacción cutánea alérgica.
H341	Susceptible de provocar defectos genéticos.
H350	Puede causar cáncer.
H370	Provoca daños en los órganos.
P201	Procurarse las instrucciones antes del uso.
P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.
P303+P361+P353	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Enjuagar la piel con agua.
P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
P310	Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. Metanol 1 - 2 % Formaldehído 5 - 10 %



La hoja de datos de seguridad está disponible en beckman.com/techdocs

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

IntraPrep se conserva a 18 – 25 °C.

Estabilidad del vial cerrado: el reactivo es estable durante 517 días.

Estabilidad del vial abierto: el reactivo es estable durante 90 días.

Consulte el certificado de análisis específico del lote en www.beckman.com.

SIGNOS DE DETERIORO

Cualquier cambio en el aspecto físico de los reactivos puede indicar un deterioro, por lo que no debe utilizarse el reactivo.

Para obtener información adicional o si el producto está dañado, llame al servicio de atención al cliente de Beckman Coulter en el 800-742-2345 (EE. UU. o Canadá) o póngase en contacto con su representante local de Beckman Coulter.

CONTENIDO

El conservante de azida sódica puede formar compuestos explosivos en las tuberías metálicas del desagüe. Véase el NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Boletín de NIOSH: Peligro de explosión con la azida) (16/8/76).

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 CON EL KIT:

- Tubos y material de muestras necesarios para el muestreo.
- Pipetas automáticas y puntas desechables para obtener volúmenes de 10, 20, 50, 100 y 500 µL.
- Tubos de hemólisis de plástico.
- Anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos.
- Controles negativos.
- Reactivo de fijación de leucocitos. Por ejemplo: Solución de fijación IOTest 3 (Ref. A07800).
- Tampón (PBS: 0,01 M de fosfato de sodio; 0,145 M de cloruro sódico; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citómetro de flujo.

PROCEDIMIENTO

A - Marcaje intracitoplasmático

La cantidad de glóbulos rojos presentes en la muestra debe ser inferior a 6×10^6 por µL (6×10^{12} /L). Diluir si es necesario en PBS.

La cantidad de leucocitos presentes en la muestra debe ser inferior a 5×10^3 /µL (5×10^9 /L). Diluir si es necesario en PBS.

Por cada muestra analizada, además del tubo de muestra problema, se puede añadir un tubo de control en el que se mezclan las células en presencia del control negativo, correspondiente a la tinción específica.

1. Añadir 50 µL de la muestra problema a cada tubo.
2. Añadir 100 µL de reactivo 1 a cada tubo. Mezclar en el vórtex vigorosamente inmediatamente después de cada adición.
3. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (18 – 25 °C).
4. Añadir 4 mL de PBS en cada tubo.
5. Centrifugar 5 minutos a 300 x g y a temperatura ambiente.
6. Elimine el sobrenadante mediante aspiración.
7. Añadir 100 µL del reactivo 2 a cada tubo. NO MEZCLAR EN VÓRTEX, dejar que el reactivo 2 difunda de forma natural dentro del sedimento celular.
8. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (18 – 25 °C) SIN AGITAR.
9. Agitar a mano con suavidad 2 o 3 segundos.
10. Añadir la cantidad necesaria de AcM (específico para un determinante antigénico intracitoplasmático) a cada tubo de muestra problema y, si es necesario, añadir la cantidad adecuada de control negativo a cada tubo de control.
11. Mezclar cada tubo suavemente en el Vórtex.
12. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) y protegido de la luz.
13. Añadir 4 mL de PBS en cada tubo.
14. Centrifugar 5 minutos a 300 x g y a temperatura ambiente.
15. Eliminar el sobrenadante por aspiración y resuspender el botón celular en 0,5 a 1 mL de Solución de Fijación IOTest 3 (Ref. A07800) a su concentración de trabajo (1X). Si se fijan de este modo, las preparaciones se conservan entre 2 y 8 °C en un lugar protegido de la luz durante 24 horas.

B - Marcaje intracitoplasmático y membranario

La cantidad de glóbulos rojos presente en la muestra debe ser inferior a 6×10^6 por µL (6×10^{12} /L). Diluir si es necesario con PBS.

La cantidad de leucocitos presentes en la muestra debe ser inferior a 5×10^3 /µL (5×10^9 /L). Diluir si es necesario con PBS.

Por cada muestra analizada, además del tubo de muestra problema, se puede añadir un tubo de control en el que se mezclan las células en presencia del control negativo, correspondiente a la tinción específica.

1. Añadir 50 µL de la muestra problema a cada tubo.
2. Añadir la cantidad necesaria de AcM (específico para un determinante antigénico de membrana) a cada tubo de muestra problema y, si es necesario, añadir la cantidad adecuada de control negativo a cada tubo de control.
3. Mezclar cada tubo suavemente en el Vórtex.
4. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) y protegido de la luz.

5. Añadir 100 µL de reactivo 1 a cada tubo. Mezclar en el vórtex vigorosamente inmediatamente después de cada adición.
6. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (18 – 25 °C).
7. Añadir 4 mL de PBS en cada tubo.
8. Centrifugar 5 minutos a 300 x g y a temperatura ambiente.
9. Elimine el sobrenadante mediante aspiración.
10. Añadir 100 µL del reactivo 2 a cada tubo. NO MEZCLAR EN VÓRTEX, dejar que el reactivo 2 difunda de forma natural dentro del sedimento celular.
11. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (18 – 25 °C) SIN AGITAR.
12. Agitar a mano con suavidad 2 o 3 segundos.
13. Añadir la cantidad necesaria de AcM (específico para un determinante antigénico intracitoplasmático) a cada tubo de muestra problema y, si es necesario, añadir la cantidad adecuada de control negativo a cada tubo de control.
14. Introducir en el tubo control 20 µL de control isotópico.
15. Mezclar cada tubo suavemente en el Vórtex.
16. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) y protegido de la luz.
17. Añadir 4 mL de PBS en cada tubo.
18. Centrifugar 5 minutos a 300 x g y a temperatura ambiente.
19. Eliminar el sobrenadante por aspiración y resuspender el botón celular en 0,5 a 1 mL de Solución de Fijación IOTest 3 (Ref. A07800) a su concentración de trabajo (1X). Fijadas de este modo, las preparaciones se conservan entre 2 y 8 °C en un lugar protegido de la luz durante 24 horas.

RENDIMIENTO

Los datos de rendimiento se obtuvieron utilizando el procedimiento descrito anteriormente en muestras de sangre con menos de 24 horas desde su extracción en tubos estériles con sal de EDTA como anticoagulante. El análisis se realizó en el plazo de 2 horas desde su inmunotinción.

PRECISIÓN

Los valores porcentuales positivos se determinaron utilizando sangre total y médula ósea. Cada muestra se procesó 4 veces, dos veces al día durante 1 día en 2 instrumentos utilizando 2 lotes de reactivo de permeabilización IntraPrep. Las mediciones (% de positivos) se realizaron en un citómetro de flujo Navios. El análisis se realizó según el método EP5-A2 del CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluación del rendimiento de la precisión de los métodos de medición cuantitativos).

Nuestro criterio de aceptación depende del número de eventos positivos determinado en cada población:

- Si el número de eventos positivos es < 1500, CV < 15 %
- Si el número de eventos positivos es > 1500, CV < 10 %

Sangre total con EDTA:

Tinción CD45/CD14 de membrana = Pureza linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 8877							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción CD45/CD14 de membrana = Recuperación linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 8877							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en monocitos							
Número de eventos positivos (media) = 1070							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en granulocitos							
Número de eventos positivos (media) = 13246							

	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sangre total con HEPARINA:

Tinción CD45/CD14 de membrana = Pureza linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 6824							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción CD45/CD14 de membrana = Recuperación linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 6824							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en monocitos							
Número de eventos positivos (media) = 961							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en granulocitos							
Número de eventos positivos (media) = 20742							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sangre total con ACD:

Tinción CD45/CD14 de membrana = Pureza linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 12355							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción CD45/CD14 de membrana = Recuperación linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 12355							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en monocitos							
Número de eventos positivos (media) = 1483							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en granulocitos							
Número de eventos positivos (media) = 32715							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Medula ósea con EDTA:

Tinción CD45/CD14 de membrana = Pureza linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 8808							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción CD45/CD14 de membrana = Recuperación linfocitaria							
Número de eventos positivos (media) = 8808							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en monocitos							
Número de eventos positivos (media) = 2212							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tinción antimieloperoxidasa-FITC intracitoplasmática en granulocitos							
Número de eventos positivos (media) = 33181							
	Entre operadores	Entre citómetros	Intralote	Entre lotes	Entre análisis	Intraanálisis	Total
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PUREZA Y RECUPERACIÓN LINFOCITARIA

La pureza y recuperación linfocitaria se han evaluado de acuerdo con las recomendaciones de los CDC (5). Las muestras de sangre de 10 donantes sanos tomadas en tubos con EDTA, heparina y ACD y 5 muestras de médula ósea se marcaron con una mezcla de anticuerpos monoclonales CD45-FITC y CD14-PE. Los valores medios de la recuperación y la pureza, así como el rango, se proporcionan en las siguientes tablas:

Sangre total con EDTA		
Parámetro	Recuperación	Pureza
Promedio	93,6	89,7
Mín./máx.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Sangre total con HEPARINA		
Parámetro	Recuperación	Pureza
Promedio	94,3	87,6
Mín./máx.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Sangre total con ACD		
Parámetro	Recuperación	Pureza
Promedio	94,2	94,6
Mín./máx.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Medula ósea con EDTA		
Parámetro	Recuperación	Pureza
Promedio	80,7	71,8
Mín./máx.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

LIMITACIONES

1. La citometría de flujo puede producir resultados falsos si el citómetro no se ha alineado a la perfección, si las fugas de fluorescencia no se han compensado correctamente y si las regiones no se han colocado con atención.
2. Algunos determinantes antigénicos pueden ser sensibles al formaldehído o a la saponina. Cada laboratorio debe validar las condiciones de utilización de AcMo.
3. Se obtendrán resultados exactos y reproducibles siempre que los procedimientos utilizados sean conformes al folleto técnico y compatibles con las prácticas correctas de laboratorio.
4. Este reactivo se ha optimizado para ofrecer la mejor relación señal específica/señal inespecífica. Por lo tanto, es importante respetar la relación volumen de reactivo/número de leucocitos y de eritrocitos en cada determinación.
5. En caso de hiper celularidad, se debe diluir la muestra en PBS para obtener un valor inferior a 5×10^9 leucocitos/L e inferior a 6×10^{12} glóbulos rojos /L (6).
6. En algunos estados de la enfermedad, como el fallo renal grave o las hemoglobinopatías, la lisis de los eritrocitos puede ser lenta, incompleta o incluso imposible. En este caso, se recomienda aislar las células mononucleares por gradiente de densidad (por ejemplo, Ficoll) antes de la tinción (7).

Consulte el anexo para ver ejemplos y referencias.

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.

INFORMACIÓN ADICIONAL

Para pacientes/usuarios/terceros de la Unión Europea y países con el mismo régimen normativo (Reglamento 2017/746/UE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro); si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se produjese un incidente grave, informe al fabricante y/o a su representante autorizado y a la autoridad nacional.

HISTORIAL DE REVISIONES

REVISIÓN AF:	Fecha de publicación: Enero de 2021
REVISIÓN AW:	
Actualizaciones para cumplir con la política de etiquetado global de Beckman Coulter y conforme a los requisitos del Reglamento (UE)2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro:	
Se han añadido secciones	Usuario previsto, Precisión, Recuperación y pureza linfocitaria, Información adicional, Historial de revisiones
Información añadida	Véanse las secciones Advertencias y precauciones, Conservación y estabilidad, Limitaciones
Se han actualizado las secciones	Advertencias y precauciones, Clasificación de material peligroso según el SGA, Conservación y estabilidad, Signos de deterioro, Procedimiento, Rendimiento
Se han eliminado secciones	Reproducibilidad intralaboratorio

Lista de símbolos

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

	Reagente 1	Reagente 2
	Agente Fixador	Agente Permeabilizante
Formulação	Líquido	Líquido
Substância Activa	Formaldeído	Saponina
Volume	5 mL	5 mL
Numero de frascos	3 frascos	3 frascos
Volume por teste	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testes; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / teste

Para fins de diagnóstico *in vitro*

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O IntraPrep consiste em dois reagentes prontos a utilizar, que induzem a permeabilidade da membrana citoplasmática dos leucócitos para a demonstração de determinantes antigénicos intracelulares através de anticorpos fluorescentes. O IntraPrep é utilizado na preparação de amostras biológicas para análise por citometria de fluxo. Tem sido optimizado de forma a minimizar a coloração não específica neste tipo de análises (1,2,3,4).

PRINCÍPIO

Como primeiro passo, as células são fixadas com o reagente 1. Após lavagem, é induzida a permeabilização com o reagente 2 e os eritrocitos que restarem são lisados. Durante este estadio, as células são postas em contacto com os anticorpos monoclonais conjugados específicos dos determinantes antigénicos intracelulares. Após, os leucócitos são analisados por citometria de fluxo.

A demonstração de determinantes antigénicos de superfície continua a ser possível. Neste caso, os anticorpos monoclonais conjugados específicos são incubados antes da fixação.

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 de coloração positiva daqueles sem coloração. Os resultados são apresentados como uma percentagem de eventos positivos em relação a todos os eventos adquiridos por meio da delimitação.

UTILIZADOR PREVISTO

Este produto destina-se a ser utilizado por profissionais de laboratório.

AMOSTRAS

As amostras de sangue venoso ou de medula óssea devem ser colhidas utilizando tubos de amostra estéreis que contenham um sal de EDTA, ACD ou heparina 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 no prazo de 24 horas após a punção venosa.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não utilize o reagente depois da data de validade.
2. Não congele.
3. Evite a exposição à luz.
4. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, caso contrário, poderão ocorrer falsos resultados.
5. O reagente 1 contém formaldeído. O formaldeído é tóxico e alergénico. É considerado um agente cancerígeno.
6. O reagente 2 contém azida sódica (NaN₃). As soluções contendo azida sódica 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 de azida sódica nos tubos de metal e para previr o risco de explosão.
7. Todas as amostras de sangue devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas com cuidado (em especial, devem ser usados óculos, batas e luvas de protecção).

8. Nunca pipete com a boca e evite qualquer contacto das amostras com a pele, as mucosas e os olhos.
9. Os tubos de sangue e os materiais descartáveis utilizados para manuseamento devem ser eliminados em recipientes específicos destinados a incineração.
10. Os reagentes e os resíduos devem ser eliminados de acordo com os requisitos locais.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Reagente 1: Fixação

PERIGO



H302	Nocivo por ingestão.
H313	Pode ser nocivo em contacto com a pele.
H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
H341	Suspeito de provocar anomalias genéticas.
H350	Pode causar cancro.
H370	Afeta os órgãos.
P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.
P303+P361+P353	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): enxaguar a pele com água.
P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
P310	Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Metanol 1 - 2% Formaldeído 5 - 10%



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

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A IntraPrep é armazenada entre 18 e 25 °C.

Estabilidade do frasco fechado: o reagente permanece estável durante 517 dias.

Estabilidade do frasco aberto: o reagente permanece estável durante 90 dias.

Consulte o Certificado de análise específico do lote em www.beckman.com.

EVIDÊNCIA DE DEGRADAÇÃO

Uma alteração no aspeto físico dos reagentes poderá indicar deterioração, pelo que o reagente não deve ser utilizado.

Para obter informações adicionais ou se o produto recebido estiver danificado, contacte a assistência ao cliente da Beckman Coulter através do número 800-742-2345 (EUA ou Canadá) ou contacte o seu representante local da Beckman Coulter.

CONTEÚDO

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos em sistemas de canalizações metálicas. Consulte o boletim do NIOSH: Explosive Azide Hazards (Perigos de explosão da azida) (16-8-76).

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

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS COM O KIT:

- Tubos de amostras e materiais necessários para amostragem.
- Pipetas automáticas com pontas descartáveis para 10, 20, 50, 100 e 500 µL.
- Tubos de plástico para hemólise.
- Anticorpos monoclonais específicos (mAb).
- Controlos negativos.
- Reagente de fixação de leucócitos. Por exemplo: solução fixadora IOTest 3 (Ref. A07800).
- Tampão (PBS: 0,01 M de fosfato de sódio; 0,145 M de cloreto de sódio; pH 7,2).
- Centrifugue.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citómetro de fluxo.

PROCEDIMENTO

A - Coloração Intracitoplasmática

A concentração de glóbulos vermelhos na amostra deve ser inferior a 6×10^6 por µL (6×10^{12} /L). Se necessário, dilua em PBS.

A concentração de leucocitos na amostra deve ser inferior a 5×10^3 por µL (5×10^9 /L). Dilua em PBS se necessário.

Além do tubo de teste, pode ser adicionado um tubo de controlo a cada amostra analisada, no qual as células são misturadas na presença do controlo negativo, correspondendo à coloração específica escolhida.

1. Adicione 50 µL da amostra de teste a cada tubo.
2. Adicione 100 µL do reagente 1 a cada tubo. Agite vigorosamente em vórtex imediatamente após cada adição.
3. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente (18 – 25 °C).
4. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
5. Centrifugue durante 5 minutos a 300 x g à temperatura ambiente.
6. Remova o sobrenadante por aspiração.
7. Adicione 100 µL do reagente 2 a cada tubo. NÃO AGITE EM VÓRTEX, deixe o reagente 2 misturar-se naturalmente no precipitado celular.
8. Incube 5 minutos à temperatura ambiente (18 – 25 °C) SEM VORTEX.
9. Agite levemente à mão 2 a 3 segundos.
10. Adicione a quantidade necessária de AcM (específico para um determinante antigénico intracitoplasmático) a cada tubo de teste e, se necessário, a quantidade adequada do controlo negativo a cada tubo de controlo.
11. Agite no vortex cuidadosamente tubo a tubo.
12. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente (18–25 °C), protegido da luz.
13. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
14. Centrifugue durante 5 minutos a 300 x g à temperatura ambiente.
15. Remova o sobrenadante por aspiração e ressuspenda o pellet celular com 0.5 mL ou 1 mL de Solução de Fixação IOTest 3 (Ref. A07800) na sua concentração de trabalho (1X). As preparações fixadas podem ser mantidas por 24 horas entre 2 e 8 °C, protegidas da luz.

B - Coloração intracitoplasmática e das membranas

A concentração de glóbulos vermelhos na amostra deve ser inferior a 6×10^6 per µL (6×10^{12} /L). Se necessário, dilua em PBS.

A concentração de leucocitos na amostra deve ser inferior a 5×10^3 por µL (5×10^9 /L). Dilua em PBS se necessário.

Além do tubo de teste, pode ser adicionado um tubo de controlo a cada amostra analisada, no qual as células são misturadas na presença do controlo negativo, correspondendo à coloração específica escolhida.

1. Adicione 50 µL da amostra de teste a cada tubo.
2. Adicione a quantidade necessária de AcM (específico para um determinante antigénico membranoso) a cada tubo de teste e, se necessário, a quantidade adequada de controlo negativo a cada tubo de controlo.
3. Agite no vortex cuidadosamente tubo a tubo.
4. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente (18–25 °C), protegido da luz.
5. Adicione 100 µL do reagente 1 a cada tubo. Agite vigorosamente em vórtex imediatamente após cada adição.
6. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente (18 – 25 °C).

7. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
8. Centrifugue durante 5 minutos a 300 x g à temperatura ambiente.
9. Remova o sobrenadante por aspiração.
10. Adicione 100 µL do reagente 2 a cada tubo. NÃO AGITE EM VÓRTEX, deixe o reagente 2 misturar-se naturalmente no precipitado celular.
11. Incube 5 minutos à temperatura ambiente (18 – 25 °C) SEM VORTEX.
12. Agite levemente à mão 2 a 3 segundos.
13. Adicione a quantidade necessária de AcM (específico para um determinante antigénico intracitoplasmático) a cada tubo de teste e, se necessário, a quantidade adequada do controlo negativo a cada tubo de controlo.
14. Ao tubo controlo, adicione 20 µL de controlo isotópico.
15. Agite no vortex cuidadosamente tubo a tubo.
16. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente (18–25 °C), protegido da luz.
17. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
18. Centrifugue durante 5 minutos a 300 x g à temperatura ambiente.
19. Remova o sobrenadante por aspiração e ressuspenda o pellet celular com 0.5 mL ou 1 mL de Solução de Fixação IOTest 3 (Ref. A07800) na sua concentração de trabalho (1X). As preparações fixadas podem ser mantidas por 24 horas entre 2 e 8 °C, protegidas da luz.

DESEMPENHO

Os dados de desempenho são obtidos utilizando o procedimento descrito acima em amostras de sangue colhidas há menos de 24 horas em tubos de amostra estéreis com sal de AEDT como anticoagulante. A análise é realizada no prazo de 2 horas após a imunocoloração.

PRECISÃO

Os valores percentuais positivos foram determinados utilizando sangue total e medula óssea. Cada amostra foi executada quatro vezes, duas vezes ao dia, durante um dia, em dois instrumentos, utilizando dois lotes de reagente de permeabilização IntraPrep. As medições (% de positivos) foram realizadas no citómetro de fluxo Navios. A análise foi realizada com base no método EP5-A2 do CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Avaliação do desempenho de precisão dos métodos de medição quantitativos).

Os nossos critérios de aceitação estão dependentes do número de eventos positivos medidos para cada população:

- Em caso de eventos positivos <1500, CV <15%
- Em caso de eventos positivos >1500, CV <10%

EDTA de sangue total:

Coloração membranosa CD45/CD14 = Pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8877							
	Interoperador	Intercitómetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Intra-processo	Total
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração membranosa CD45/CD14 = Recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8877							
	Interoperador	Intercitómetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Intra-processo	Total
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 1070							
	Interoperador	Intercitómetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Intra-processo	Total
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 13246							
	Interoperador	Intercitómetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Intra-processo	Total
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

HEPARINA de sangue total:

Coloração membranosa CD45/CD14 = Pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 6824							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração membranosa CD45/CD14 = Recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 6824							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 961							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 20742							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ADC de sangue total:

Coloração membranosa CD45/CD14 = Pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 12355							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração membranosa CD45/CD14 = Recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 12355							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 1483							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 32715							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EDTA de medula óssea:

Coloração membranosa CD45/CD14 = Pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8808							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração membranosa CD45/CD14 = Recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8808							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocesso	Anteaprocessame	Total
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 2212							

	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocessamento	Interprocessamento	Total
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 33181							
	Interoperador	Intercitômetro	Intralote	Interlote	Interprocessamento	Interprocessamento	Total
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

RECUPERAÇÃO E PUREZA LINFOCÍTICAS

A recuperação e a pureza linfocíticas foram avaliadas de acordo com as recomendações do CDC (5). A amostra de sangue de 10 doadores saudáveis em EDTA, heparina e ADC, e cinco medulas ósseas foram etiquetadas com uma mistura de anticorpos monoclonais CD45-FITC e CD14-PE. Os valores médios da recuperação e da pureza, bem como o intervalo, são fornecidos nas seguintes tabelas:

EDTA de sangue total		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	93,6	89,7
Mín./máx.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

HEPARINA de sangue total		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	94,3	87,6
Mín./máx.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

ADC de sangue total		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	94,2	94,6
Mín./máx.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

EDTA de medula óssea		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	80,7	71,8
Mín./máx.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

LIMITAÇÕES

1. A citometria de fluxo poderá produzir falsos resultados se o citômetro não tiver sido perfeitamente alinhado, se as fugas de fluorescência não tiverem sido compensadas corretamente e se as regiões não tiverem sido cuidadosamente posicionadas.
2. Alguns determinantes antigênicos podem ser sensíveis ao formaldeído ou à saponina. Cada laboratório deve validar as suas próprias condições de utilização dos anticorpos monoclonais.
3. Serão obtidos resultados exatos e reprodutíveis desde que os procedimentos utilizados estejam de acordo com o folheto técnico e cumpram as boas práticas laboratoriais.
4. Este reagente tem sido otimizado de modo a oferecer a melhor razão sinal específico/não específico. Assim, é importante ter em conta a razão volume de reagente/ número de leucócitos e eritrócitos em cada teste.
5. No caso de hiperplasia, dilua a amostra em PBS para obter uma concentração inferior a 5×10^9 de leucócitos/L e inferior a 6×10^{12} de glóbulos vermelhos/L (6).
6. Em determinados estados de doença, como insuficiência renal grave ou hemoglobinopatias, a lise de glóbulos vermelhos poderá ser lenta, incompleta ou até impossível. Neste caso, recomenda-se isolar células mononucleadas utilizando um gradiente de densidade (por exemplo, Ficoll) antes da coloração (7).

Consulte o Anexo para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

Beckman Coulter, o logótipo estilizado e as marcas de produtos e serviços da Beckman Coulter mencionadas neste documento são marcas comerciais ou marcas comerciais registadas da Beckman Coulter, Inc. nos Estados Unidos e noutros países.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para um paciente/utilizador/terceiro na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/UE relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro): se, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, ocorrer um incidente grave, comunique-o ao fabricante e/ou ao respetivo representante autorizado e à autoridade nacional.

HISTÓRICO DE REVISÕES

REVISÃO AF:	Data de lançamento: Janeiro de 2021
REVISÃO AW:	
Atualizações no sentido de cumprir a política de rotulagem da Beckman Coulter Global e os requisitos do regulamento IVD-R (UE)2017/746:	
Secções adicionadas	Utilizador previsto, Precisão, Recuperação e pureza linfocíticas, Informações adicionais, Histórico de revisões
Informações adicionadas	Consulte as secções Avisos e precauções, Armazenamento e estabilidade, Limitações
Secções atualizadas	Avisos e precauções, Classificação de perigo do GHS, Armazenamento e estabilidade, Sinais de deterioração, Procedimento, Desempenho
Secções removidas	Reprodutibilidade intralaboratorial

Legenda dos símbolos

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

	Reagens 1	Reagens 2
	Fikseringsmiddel	Permeabilitetsmiddel
Formulering	Væske	Væske
Aktivt stof	Formaldehyd	Saponin
Bind	5 mL	5 mL
Antal hætteglas	3 hætteglas	3 hætteglas
Volumen pr. test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 tests; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / test

Til *in vitro*-diagnostisk brug

TILSIGTET BRUG

IntraPrep består af to brugsklare reagenser, som inducerer permeabilitet i leukocyternes cytoplasmamembran, således at intracellulære antigendeterminanter bliver tilgængelige for fluorescerende monoklonale antistoffer. IntraPrep anvendes til præparation af biologiske prøver med henblik på flowcytometrisk analyse. Det er optimeret til at minimere uspecifik farvning i denne type analyse (1,2,3,4).

PRINCIP

Som et første trin fikseres cellerne med reagens 1. Efter vask induceres permeabiliteten med reagens, og de resterende erythrocytter lyses. I dette trin bringes cellerne i kontakt med konjugerede monoklonale antistoffer, der er specifikke for intracellulære antigendeterminanter. Derefter analyseres leukocyterne ved flowcytometri.

I desto mindre forbliver påvisning af antigendeterminanter på celleoverfladen mulig. I dette tilfælde inkuberes der med de specifikke, konjugerede monoklonale antistoffer inden fiksering.

Flowcytometret måler lysdiffusion og cellernes fluorescens. Dette gør det muligt at lokalisere den interessante population inden for et elektronisk vindue defineret på et histogram, som korrelerer den orthogonale lysdiffusion (Side Scatter eller SS) diffusionen af snærvinklet lys (Forward Scatter eller FS). Andre histogrammer, der kombinerer to af de forskellige parametre tilgængelige på cytometret, kan anvendes som hjælp i gating-stadiet afhængigt af den af brugeren valgte applikation.

De afgrænsede cellers fluorescens analyseres med henblik på at kunne skelne de positive farvningshændelser fra de ufarvede. Resultaterne udtrykkes som en procentdel af positive hændelser i relation til alle de hændelser, som erhveres ved gatingen.

TILSIGTET BRUGER

Dette produkt er beregnet til professionel brug i laboratoriet.

PRØVER

Prøver af venøst blod eller knoglemarv skal udtages i sterile prøverør, der indeholder et EDTA-salt eller ACD eller heparin som antikoagulant.

Prøverne skal opbevares ved stuetemperatur (18 – 25 °C) og må ikke omrystes. Prøverne skal homogeniseres ved forsigtig omrystning inden udtagelse af testprøven.

Prøverne skal behandles inden for 24 timer efter venepunktur.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Brug ikke reagentet efter udløbsdatoen.
2. Må ikke nedfryses.
3. Minimér eksponering for lys.
4. Undgå mikrobiel kontaminering reagenserne, idet det kan føre til fejlagtige resultater.
5. Reagens 1 indeholder formaldehyd. Formaldehyd er toksisk og allergifremkaldende. Det menes at være kræftfremkaldende.
6. Reagens 2 indeholder natriumazid (NaN₃). Det skal håndteres forsigtigt. Må ikke indtages. Undgå kontakt med hud, slimhinder og øjne. Endvidere kan natriumazid i sure omgivelser danne potentielt farligt hydrogenazid. Ved bortskaffelse anbefales det, at reagentet fortyndes i et stort volumen vand, inden det hældes i afløbet, for at undgå ophobninger af natriumazid i metalrør og for at forebygge eksplosionsrisikoen.
7. Alle blodprøver skal anses som potentielt smittefarlige og skal behandles forsigtigt (husk især at bruge beskyttelseshandsker, forklæde og beskyttelsesbriller).
8. Sug aldrig med munden, og undgå at prøverne kommer i kontakt med hud, slimhinde og øjne.

9. Blodprøvetagningsrør og engangsmateriale, der bruges i forbindelse med håndteringen, skal bortskaffes i ad hoc-beholdere, der er beregnet til bortskaffelse.

10. Reagenser og affald skal bortskaffes i henhold til gældende lokale krav.

GHS FAREKLASSIFIKATION

Reagens 1: Fiksering

FARE



H302	Farlig ved indtagelse.
H313	Kan være farlig ved hudkontakt.
H314	Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader.
H317	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
H341	Mistænkt for at forårsage genetiske defekter.
H350	Kan fremkalde kræft.
H370	Forårsager organskader.
P201	Indhent særlige anvisninger før brug.
P280	Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.
P303+P361+P353	VED KONTAKT MED HUDEN (eller håret): Skyl under koldt vand.
P305+P351+P338	VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
P310	Ring straks til en GIFTINFORMATION eller en læge. Methanol 1 - 2% Formaldehyd 5 - 10%



Sikkerhedsdatablad findes på beckman.com/techdocs

OPBEVARING OG HOLDBARHED

IntraPrep skal opbevares ved 18 – 25 °C.

Stabilitet i lukket hætteglas: Reagenset er stabilt i 517 dage.

Stabilitet i åbent hætteglas: Reagenset er stabilt i 90 dage.

Se lotspecifikt analysecertifikat på www.beckman.com.

TEGN PÅ FORRINGELSE

Ændringer i den måde, reagenset ser ud på, kan være tegn på forringelse, og reagenset må ikke anvendes.

Ring til Beckman Coulters kundeservice på 800-742-2345 (USA eller Canada), eller kontakt den lokale Beckman Coulter-repræsentant for at få flere oplysninger, eller hvis du modtager et beskadiget produkt.

INDHOLD

Natriumazid kan danne eksplosive forbindelser i drænledninger af metal. Se NIOSH-bulletin: Explosive Azide Hazard (16.8.76) (Fare for eksplosiv azid).

For at undgå en eventuel akkumulering af azidforbindelser, skylles afløbsrør med vand efter bortskaffelse af uført reagens. Natriumazid skal bortskaffes i overensstemmelse med relevante lokale forskrifter.

PÅKRÆVEDE MATERIALER, SOM IKKE LEVERES MED SÆT:

- Prøvetagningsrør og materiale, der er påkrævet til prøvetagning.
- Automatiske pipetter med engangsspidser til 10, 20, 50, 100 og 500 µL.
- Plasthæmolysrør.

- Specifikke monoclonale antistoffer (mAb).
- Negative kontroller.
- Reagens til leukocytfiksering. For eksempel: IOTest 3-fiksativ opløsning (ref. A07800).
- Buffer (PBS: 0,01 M natriumphosphat; 0,145 M natriumchlorid; pH 7,2).
- Centrifuge
- Automatisk omrører (vortextype).
- Flowcytometer.

PROCEDURE

A - Intracytoplasmatisk farvning

Antallet af erythrocytter til stede i prøven skal være mindre end 6×10^6 pr. μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Fortynd om nødvendigt i PBS.

Antallet af leukocyter til stede i prøven skal være mindre end $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Fortynd om nødvendigt i PBS.

Der kan tilføjes et kontrolrør for hvert prøverør, der analyseres, hvori cellerne blandes under tilstedeværelse af den negative kontrol, som svarer til den specifikke farvning, der er valgt.

1. Tilsæt 50 μL af prøven til hvert rør.
2. Tilsæt 100 μL reagens 1 til hvert rør. Vortex kraftigt umiddelbart efter hver tilsætning.
3. Inkuber i 15 minutter ved stuetemperatur (18 – 25 °C).
4. Tilsæt 4 mL PBS i hvert prøverør.
5. Centrifuger i 5 minutter ved 300 x g ved stuetemperatur.
6. Fjern supernatanten via aspiration.
7. Tilsæt 100 μL af reagens 2 til hvert rør. MÅ IKKE VORTEXES, lad reagens 2 diffundere naturligt ind i cellepelletten.
8. Inkuber i 5 minutter ved stuetemperatur (18 – 25 °C) UDEN OMRYSTNING.
9. Ryst langsomt med hånden i 2 til 3 sekunder.
10. Tilsæt den nødvendige mængde mAb (specifik for en intracytoplasmisk antigendeterminant) til hvert prøverør, og tilsæt om nødvendigt den relevante mængde negativ kontrol til hvert kontrolrør.
11. Vortex røret forsigtigt.
12. Inkubér i 15 minutter ved stuetemperatur (18-25 °C), beskyttet mod lys.
13. Tilsæt 4 mL PBS i hvert prøverør.
14. Centrifuger i 5 minutter ved 300 x g ved stuetemperatur.
15. Fjern supernatanten ved aspiration og resuspender cellepelletten i 0,5 eller 1 mL IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) ved dets brugskoncentration (1X). Præparationer fikseret på denne måde kan opbevares i 24 timer ved mellem 2 og 8 °C beskyttet mod lys.

B - Intracytoplasmatisk farvning og membranfarvning

Antallet af erythrocytter til stede i prøven skal være mindre end 6×10^6 pr. μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Fortynd om nødvendigt med PBS.

Antallet af leukocyter i prøven skal være mindre end $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Fortynd om nødvendigt med PBS.

Der kan tilføjes et kontrolrør for hvert prøverør, der analyseres, hvori cellerne blandes under tilstedeværelse af den negative kontrol, som svarer til den specifikke farvning, der er valgt.

1. Tilsæt 50 μL af prøven til hvert rør.
2. Tilsæt den nødvendige mængde mAb (specifik for en membranøs antigendeterminant) til hvert prøverør, og tilsæt om nødvendigt den relevante mængde negativ kontrol til hvert kontrolrør.
3. Vortex røret forsigtigt.
4. Inkubér i 15 minutter ved stuetemperatur (18-25 °C), beskyttet mod lys.
5. Tilsæt 100 μL reagens 1 til hvert rør. Vortex kraftigt umiddelbart efter hver tilsætning.
6. Inkuber i 15 minutter ved stuetemperatur (18 – 25 °C).
7. Tilsæt 4 mL PBS i hvert prøverør.
8. Centrifuger i 5 minutter ved 300 x g ved stuetemperatur.
9. Fjern supernatanten via aspiration.
10. Tilsæt 100 μL af reagens 2 til hvert rør. MÅ IKKE VORTEXES, lad reagens 2 diffundere naturligt ind i cellepelletten.

11. Inkuber i 5 minutter ved stuetemperatur (18 – 25 °C) UDEN OMRYSTNING.
12. Ryst langsomt med hånden i 2 til 3 sekunder.
13. Tilsæt den nødvendige mængde mAb (specifik for en intracytoplasmisk antigendeterminant) til hvert prøverør, og tilsæt om nødvendigt den relevante mængde negativ kontrol til hvert kontrolrør.
14. Tilsæt 20 µL isotypekontrol til hvert isotypekontrolrør.
15. Vortex røret forsigtigt.
16. Inkubér i 15 minutter ved stuetemperatur (18-25 °C), beskyttet mod lys.
17. Tilsæt 4 mL PBS i hvert prøverør.
18. Centrifuger i 5 minutter ved 300 x g ved stuetemperatur.
19. Fjern supernatanten ved aspiration og resuspender cellepelletten i 0,5 eller 1 mL IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) ved dettes brugskoncentration (1X). Præparationer fikseret på denne måde kan opbevares i 24 timer ved mellem 2 og 8 °C beskyttet mod lys.

YDEEVNE

Præstationsdata opnås, når proceduren beskrevet foroven, anvendes på mindre end 24 timer gamle blodprøver, tidligere indsamlet i sterile prøverør med EDTA-salt som antikoagulant. Analyse skal foretages senest 2 timer efter immunfarvning.

PRÆCISION

De procentvise positive værdier blev bestemt ved anvendelse af fuldblod og knoglemarv. Hver prøve blev kørt 4 gange, to gange dagligt i 1 dag, på 2 instrumenter med IntraPrep-permeabiliseringsreagens fra 2 lots. Målingerne (% positiv) blev foretaget på Navios-flowcytometer. Analysen blev udført i henhold til CLSI-metoden EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluering af kvantitative målemetoders præcisionsevne).

Vores acceptkriterier afhænger af antallet af positive hændelser målt for hver population:

- Hvis positiv hændelse < 1500, CV < 15%
- Hvis positiv hændelse > 1500, CV < 10%

Fuldblod EDTA:

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk renhedsgrad							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 8877							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk gendannelse							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 8877							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxydase-FITC intracytoplasmisk farvning på monocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 1070							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxydase-FITC intracytoplasmisk farvning på granulocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 13246							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Fuldblod HEPARIN:

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk renhedsgrad							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 6824							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk gendannelse							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 6824							
	Inter-operator	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC intracytoplasmisk farvning på monocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 961							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC intracytoplasmisk farvning på granulocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 20742							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Fuldblod ACD:

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk renhedsgrad							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 12355							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk gendannelse							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 12355							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC intracytoplasmisk farvning på monocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 1483							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC intracytoplasmisk farvning på granulocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 32715							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Knoglemarv EDTA:

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk renhedsgrad							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 8808							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfarvning = lymfocytisk gendannelse							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 8808							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC intracytoplasmisk farvning på monocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 2212							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC intracytoplasmisk farvning på granulocytter							
Antal positive hændelser (middelværdi) = 33181							
	Inter-operatør	Inter-cytometer	Intra-lot	Inter-lot	Inter-kørsel	Intra-kørsel	I alt
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LYMFOCYTISK GENDANNELSE OG RENHEDSGRAD

Lymfocytisk gendannelse og renhedsgrad er blevet evalueret i henhold til anbefalingerne fra CDC (5). Blod fra 10 raske donorer, der blev opsamlet i EDTA, heparin og ACD, samt 5 knoglemarvsprøver blev mærket med en blanding af monoklonale antistoffer CD45-FITC og CD14-PE. Middelværdierne for gendannelse og renhedsgrad samt området er angivet i følgende tabeller:

Fuldblod EDTA		
Parameter	Gendannelse	Renhed
Gennemsnit	93,6	89,7
Min./maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Fuldblod HEPARIN		
Parameter	Gendannelse	Renhed
Gennemsnit	94,3	87,6
Min./maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Fuldblod ACD		
Parameter	Gendannelse	Renhed
Gennemsnit	94,2	94,6
Min./maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Knoglemarv EDTA		
Parameter	Gendannelse	Renhed
Gennemsnit	80,7	71,8
Min./maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

BEGRÆNSNINGER

1. Flowcytometri kan give forkerte resultater, hvis cytometeret ikke er perfekt justeret, hvis der ikke er blevet kompenseret korrekt for fluorescenslækager, eller hvis områderne ikke er blevet placeret omhyggeligt.
2. Visse antigendeterminanter kan være følsomme over for formaldehyd eller saponin. Hvert enkelt laboratorium skal validere betingelserne for anvendelse af monoklonale antistoffer.
3. Der genereres nøjagtige og reproducerbare resultater, så længe de anvendte procedurer er i overensstemmelse med de tekniske anvisninger på indlægseddelen og god laboratoriepraksis.
4. Dette reagens er optimeret, så det giver det bedste forhold mellem specifikt og uspecifikt signal. Det er derfor vigtigt at overholde forholdet mellem reagensvolumen og antallet af leukocytter og erythrocytter i alle test.
5. I tilfælde af hypercellularitet skal prøven fortyndes i PBS, så der opnås mindre end 5×10^9 leukocytter/L og mindre end 6×10^{12} erythrocytter/L (6) (6).
6. I visse sygdomstilstande, f.eks. alvorligt nyresvigt eller hæmoglobinopati, kan lysning af røde celler være langsom, ufuldstændig eller endog umulig. I dette tilfælde anbefales det at isolere enkernede celler ved hjælp af en densitetsgradient (f.eks. Ficoll) forud for farvningen (7).

Se Tillæg for eksempler og referencer.

VAREMÆRKER

Beckman Coulter, det stiliserede logo og de Beckman Coulter produkt- og servicemærker, der er omtalt heri, er varemærker eller registrerede varemærker tilhørende Beckman Coulter, Inc. i USA og andre lande.

YDERLIGERE OPLYSNINGER

For en patient/bruger/tredjepart i Den Europæiske Union og i lande med identisk lovgivningsmæssig reguleringsordning (forordning 2017/746/EU om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik); hvis der er sket en alvorlig hændelse under brugen af dette apparat eller som et resultat af dens anvendelse, skal du rapportere den til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og til din nationale myndighed.

REVISIONSHISTORIK

REVISION AF:	Udgivelsesdato: januar 2021
REVISION AW:	
Opdateringer for at sikre overholdelse af Beckman Coulters globale mærkningspolitik og overensstemmelse med IVD-R (EU)2017/746:	
Tilføjede afsnit	Tilsigtet bruger, Præcision, Lymfocytisk gendannelse og renhedsgrad, Yderligere oplysninger, Revisionshistorik
Tilføjet information	Se afsnittene Advarsler og forholdsregler, Opbevaring og holdbarhed, Begrænsninger
Opdaterede afsnit	Advarsler og forholdsregler, GHS-fareklassifikation, Opbevaring og holdbarhed, Tegn på forringelse, Procedure, Præstation
Fjernede afsnit	Reproducerbarhed inden for laboratoriet

Symbolnøgle

En ordliste over symboler findes på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Reagens 1	Reagens 2
	Fixering	Permeabilisering
Formula	Lösning	Lösning
Aktiv substans	Formaldehyd	Saponin
Volym	5 mL	5 mL
Antal ampuller	3 ampuller	3 ampuller
Volym per test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 tester; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / teste

För *in vitro*-diagnostik

AVSEDD ANVÄNDNING

IntraPrep består av två reagens färdiga att använda. Dessa inducerar permeabilitet i cytoplasmamembran hos leukocyter, för påvisande av intracellulära antigen-determinanter med hjälp av monoklonala fluorescerande antikroppar. IntraPrep används för att preparera biologiska prover för flödescytometrisk analys. Det har optimerats för att minimera den ospecifika inbindningen vid denna typ av analys (1,2,3,4).

PRINCIP

Som första steg fixeras cellerna med reagens 1. Efter tvätt induceras permeabilitet med reagens 2 och kvarvarande erythrocyter lyseras. Under detta stadium mixas cellerna med konjugerade monoklonala antikroppar specifika för intracellulära antigen-determinanter. Leukocyterna analyseras sedan med flödescytometri.

Påvisande av ytantigen-determinanter är icke desto mindre fortfarande möjlig. I sådant fall inkuberas dessa specifika konjugerade monoklonala antikropparna före fixering.

Flödescytometern mäter ljusdiffusion och fluorescens på celler. Den möjliggör avgränsningen av den intressanta populationen inom det elektroniska fönstret definierat på ett histogram, vilket korrelerar den orthogonala diffusionen av ljus (Side Scatter eller SS) och diffusionen av närvinklat ljus (Forward Scatter eller FS). Andra histogram som kombinerar två av de olika parametrar som finns tillgängliga på cytometern, kan användas som hjälp i gating stadiet beroende på applikationen som användaren valt.

Fluorescensen av de begränsade cellerna analyseras för att skilja ut positivt färgade händelser från ofärgade händelser. Resultaten uttrycks som en procentandel av positiva händelser i relation till alla händelser som samlats in med hjälp av gating.

AVSEDD ANVÄNDARE

Denna produkt är avsedd för yrkesmässig laboratorieanvändning.

PROVER

Venblod- eller benmärgsprov måste tas i sterila provrör med EDTA-salt eller ACD eller heparin som antikoagulant.

Proverna ska förvaras i rumstemperatur (18 –25 °C) och får inte skakas. Provet ska homogeniseras genom varsam blandning innan pipettering.

Proverna måste analyseras inom 24 timmar efter venpunktur.

VARNING OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Använd inte reagenset efter utgångsdatumet.
2. Får ej frysas.
3. Minimera exponering för ljus.
4. Undvik mikrobiell kontaminering av reagens. Det kan leda till felaktiga resultat.
5. Reagens 1 innehåller formaldehyd. Formaldehyd är giftigt och allergiframkallande. Det tros vara ett cancerframkallande ämne.
6. Reagens 2 innehåller Natriumazid (NaN₃). Det måste handhas med försiktighet. Använd ej invärtes och undvik all kontakt med skinn, slemhinnor och ögon. Vidare kan natriumazid under sura förhållanden bilda den mycket farliga hydrazinsyran. Om reagenset måste kasseras rekommenderas utspädning med stora mängder vatten innan det hålls ut i avloppssystemet. Detta för att undvika ansamling av natriumazid i avloppsrören med explosionsrisk som följd.
7. Alla blodprover måste betraktas som potentiellt smittsamma och ska hanteras med försiktighet (i synnerhet vad gäller användande av skyddshandskar, rockar och skyddsglasögon).
8. Pipettera aldrig med munnen och se till att proverna inte kommer i kontakt med hud, slemhinnor och ögon.
9. Blodprovsvrör och engångsmaterial som används för hantering ska kasseras i särskilda behållare avsedda för förbränning.

10. Reagens och avfall ska kasseras i enlighet med lokala krav.

RISKKLASSIFICERING ENLIGT GHS

Reagent 1: Fixation

FARA



H302	Skadligt vid förtäring.
H313	Kan vara skadligt vid hudkontakt.
H314	Orsakar svåra frätskador på hud och ögon.
H317	Kan orsaka allergisk hudreaktion.
H341	Misstänks kunna orsaka genetiska defekter.
H350	Kan ge cancer.
H370	Orsakar organskador.
P201	Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P280	Använd skyddshandskar, skyddskläder, ögonskydd/ansiktsskydd.
P303+P361+P353	VID HUDKONTAKT (även håret): Skölj huden med vatten.
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P310	Kontakta omedelbart en GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Metanol 1 - 2 % Formaldehyd 5 - 10 %



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

FÖRVARING OCH STABILITET

IntraPrep förvaras vid 18 – 25 °C.

Stabiliteten i stängd ampull: reagenset är stabilt i 517 dagar.

Stabilitet i öppen ampull: reagenset är stabilt i 90 dagar.

Se lotspecifikt analyscertifikat på www.beckman.com.

TECKEN PÅ FÖRSÄMRING

Alla förändringar i reagensens fysiska utseende kan indikera försämring och att reagenset inte ska användas.

För mer information eller om en skadad produkt tas emot, ring Beckman Coulter kundtjänst på 800-742-2345 (USA eller Kanada) eller kontakta din lokala Beckman Coulter-representant.

INNEHÅLL

Konserveringsmedlet natriumazid kan bilda explosiva föreningar i avloppsledning av metall. Se NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (76-8-16) (Bulletin från den amerikanska motsvarigheten till arbetsmiljöverket: Fara för azidexplosion).

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

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED KITET:

- Provrör och nödvändigt material för provtagning.
- Automatpipetter med tillhörande engångsspetsar för 10, 20, 50, 100 och 500 µL.
- Hemolysrör av plast.
- Specifika monoklonala antikroppar (mAb).
- Negativa kontroller.
- Reagens för leukocytfixering. Till exempel: IOTest 3-fixeringslösning (ref. A07800).

- Buffert (PBS: 0,01 M natriumfosfat; 0,145 M natriumklorid; pH 7,2).
- Centrifugera.
- Automatisk omrörare (Vortex-typ).
- Flödescytometer.

PROCEDUR

A - Intracytoplasmatisk inmärkning

Antalet röda blodkroppar i provet ska vara mindre än 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Späd om nödvändigt med PBS.

Antalet leukocyter i provet ska vara mindre än $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Späd om nödvändigt med PBS.

För varje analyserat prov kan, förutom provröret, ett kontrollrör läggas till i vilket cellerna blandas i närvaro av den negativa kontrollen, som motsvarar den specifika färgning som valts.

1. Tillsätt 50 μL av testprovet i varje provrör.
2. Tillsätt 100 μL av reagens 1 i varje provrör. Vortexblanda kraftigt omedelbart efter varje tillsats.
3. Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur (18 – 25 °C).
4. Tillsätt 4 mL av PBS i varje provrör.
5. Centrifugera i 5 minuter vid 300 x g i rumstemperatur.
6. Avlägsna ytskiktet genom aspiration.
7. Tillsätt 100 μL av reagens 2 i varje provrör. VORTEXBLANDA INTE; låt reagens 2 diffundera naturligt in i cellpelleten.
8. Inkubera i 5 minuter vid rumstemperatur (18 – 25 °C) UTAN ATT SKAKA.
9. Skaka sakta för hand i 2 till 3 sekunder.
10. Tillsätt den nödvändiga mängden mAb (specifik för en intracytoplasmatisk antigendeterminant) i varje provrör och, om nödvändigt, tillsätt lämplig mängd negativ kontroll i varje kontrollrör.
11. Vortexa försiktigt rör för rör.
12. Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur (18–25 °C) och skyddat mot ljus.
13. Tillsätt 4 mL av PBS i varje provrör.
14. Centrifugera i 5 minuter vid 300 x g i rumstemperatur.
15. Avlägsna supernatanten genom aspiration och resuspendera cellpelleten i 0.5 eller 1 mL IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) brukslösning, koncentration (1X). Sålunda fixerade, kan preparationerna förvaras, mellan 2 och 8 °C skyddade för ljus, i 24 timmar.

B - Intracytoplasmatisk och membraninmärkning

Antalet röda blodkroppar i provet ska vara mindre än 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Späd om nödvändigt med PBS.

Antalet leukocyter i provet ska vara mindre än $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Späd om nödvändigt med PBS.

För varje analyserat prov kan, förutom provröret, ett kontrollrör läggas till i vilket cellerna blandas i närvaro av den negativa kontrollen, som motsvarar den specifika färgning som valts.

1. Tillsätt 50 μL av testprovet i varje provrör.
2. Tillsätt den nödvändiga mängden mAb (specifik för en membranös antigendeterminant) i varje provrör och, om nödvändigt, tillsätt lämplig mängd negativ kontroll i varje kontrollrör.
3. Vortexa försiktigt rör för rör.
4. Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur (18–25 °C) och skyddat mot ljus.
5. Tillsätt 100 μL av reagens 1 i varje provrör. Vortexblanda kraftigt omedelbart efter varje tillsats.
6. Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur (18 – 25 °C).
7. Tillsätt 4 mL av PBS i varje provrör.
8. Centrifugera i 5 minuter vid 300 x g i rumstemperatur.
9. Avlägsna ytskiktet genom aspiration.
10. Tillsätt 100 μL av reagens 2 i varje provrör. VORTEXBLANDA INTE; låt reagens 2 diffundera naturligt in i cellpelleten.
11. Inkubera i 5 minuter vid rumstemperatur (18 – 25 °C) UTAN ATT SKAKA.
12. Skaka sakta för hand i 2 till 3 sekunder.
13. Tillsätt den nödvändiga mängden mAb (specifik för en intracytoplasmatisk antigendeterminant) i varje provrör och, om nödvändigt, tillsätt lämplig mängd negativ kontroll i varje kontrollrör.

14. Tillsätt 20 µL isotypisk kontroll till varje kontrollrör.
15. Vortexa försiktigt rör för rör.
16. Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur (18–25 °C) och skyddat mot ljus.
17. Tillsätt 4 mL av PBS i varje provrör.
18. Centrifugera i 5 minuter vid 300 x g i rumstemperatur.
19. Avlägsna supernatanten genom aspiration och resuspendera cellpelleten i 0.5 eller 1 mL IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) brukslösning, koncentration (1X). Sålunda fixerade, kan preparationerna förvaras, mellan 2 och 8 °C skyddade för ljus, i 24 timmar.

PRESTANDA

Prestandadata erhålls med proceduren som beskrivs ovan på blodprov som är färskare än 24 timmar som tagits i sterila provrör med EDTA-salt som antikoagulant. Analys utförs inom 2 timmar efter immunfärgning.

PRECISION

Procentvärdet för positiva värden bestämdes med helblod och benmärg. Varje prov kördes 4 gånger, två gånger om dagen under 1 dag på 2 instrument med 2 loter av IntraPrep permeabiliseringsreagens. Mätningar (% positiva) utfördes på Navios flödescytometer. Analysen utfördes baserat på CLSI-metod EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Utvärdering av precisionsprestanda för kvantitativa mätmetoder).

Våra acceptanskriterier beror på antalet positiva händelser som uppmäts för varje population:

- Om positiv händelse < 1 500, CV < 15 %
- Om positiv händelse > 1 500, CV < 10 %

Helblods-EDTA:

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytisk renhet							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 8877							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytiskt utbyte							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 8877							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på monocyper							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 1070							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på granulocyter							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 13246							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Helblods-HEPARIN:

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytisk renhet							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 6824							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytiskt utbyte							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 6824							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt

CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på monocytter							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 961							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på granulocyter							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 20742							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Helblods-ACD:

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytisk renhet							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 12355							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytiskt utbyte							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 12355							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på monocytter							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 1483							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på granulocyter							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 32715							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Benmärgs-EDTA:

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytisk renhet							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 8808							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranfärgning = lymfocytiskt utbyte							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 8808							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på monocytter							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 2212							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-Myeloperoxidase-FITC intracytoplasmatisk färgning på granulocyter							
Antal positiva händelser (medelvärde) = 33181							
	Mellan operatörer	Mellan cytometrar	Inom lot	Mellan loter	Mellan körningar	Inom körning	Totalt
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RESULTAT	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LYMFOCYTISK RENHET OCH UTBYTE

Lymfocytisk renhet och utbyte har utvärderats enligt rekommendationerna från CDC (5). Blodet från 10 friska donatorer provtaget i EDTA, heparin och ACD samt 5 benmärg märktes med en blandning av de monoklonala antikropparna CD45-FITC och CD14-PE. Medelvärdena för utbyte och renhet samt intervallet anges i följande tabeller:

Helblods-EDTA		
Parameter	Utbyte	Purity
Genomsnittlig	93,6	89,7
Min/Max	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Helblods-HEPARIN		
Parameter	Utbyte	Purity
Genomsnittlig	94,3	87,6
Min/Max	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Helblods-ACD		
Parameter	Utbyte	Purity
Genomsnittlig	94,2	94,6
Min/Max	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Benmärgs-EDTA		
Parameter	Utbyte	Purity
Genomsnittlig	80,7	71,8
Min/Max	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

BEGRÄNSNINGAR

- Flödescytometri kan ge falska resultat om cytometern inte har justerats perfekt, om fluorescensläckor inte har kompenserats korrekt och om regionerna inte har placerats noggrant.
- Vissa antigendeterminanter kan vara känsliga för formaldehyd eller för saponin. Varje laboratorium måste validera villkoren för användning av monoklonala antikroppar.
- Noggranna och reproducerbara resultat kommer att erhållas så länge de förfaranden som används är i enlighet med den tekniska bipacksedeln och förenliga med god laboratoriepraxis.
- Detta reagens har optimerats till att ge bästa kvot: specifik signal/icke-specifik signal. Därför är det viktigt att hålla fast vid kvoten: reagensvolym/antal leukocyter resp. erythrocyter vid varje analys.
- Vid hypercelluläritet, späd blodet i PBS för att erhålla ett värde mindre än 5×10^9 leukocyter/L och mindre än 6×10^{12} röda blodkroppar/L (6).
- Vid vissa sjukdomstillstånd, såsom vid mycket svår njursvikt eller hemoglobinopatier, kan lysning av röda celler 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 bilagan för exempel och referenser.

VARUMÄRKEN

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

YTTERLIGARE INFORMATION

För en patient/användare/tredje part inom EU och i länder med identiskt regelsystem (förordning 2017/746/EU om medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik); om, vid användning av denna enhet eller som ett resultat av dess användning, en allvarig incident inträffat ska den rapporteras till tillverkaren och/eller till dess auktoriserade representant och till den nationella myndigheten.

REVISIONSHISTORIK

REVIDERING AF:	Publiceringsdatum: Januari 2021
----------------	---------------------------------

REVIDERING AW:	
Uppdateringar för att uppfylla Beckman Coulter globala etiketteringspolicy och kraven i IVD-R (EU)2017/746:	
Tillagda avsnitt	Avsedd användare, Precision, Lymfocytiskt utbyte och renhet, Ytterligare information, Revisionshistorik
Tillagd information	Se avsnitten Varning och försiktighetsåtgärder, Förvaring och hållbarhet, Begränsningar
Uppdaterade avsnitt	Varning och försiktighetsåtgärder, Riskklassificering enligt GHS, Förvaring och hållbarhet, Tecken på försämring, Procedur, Prestanda
Borttagna avsnitt	Reproducerbarhet inom laboratoriet

Teckenförklaring för symboler

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

	Reagens 1	Reagens 2
	Fikseringsagent	Permeabilitetsagent
Formulering	Væske	Væske
Aktiv substans	Formaldehyd	Saponin
Volum	5 mL	5 mL
Antall glass	3 glass	3 glass
Volum per test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 tester, 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / test

For *in vitro*-diagnostisk bruk

TILTENKT BRUK

IntraPrep består av to bruksklare reagenser, som øker permeabiliteten til den cytoplasmiske membranen for leukocytter, for påvisning av intracellulære antigendeterminanter ved hjelp av monoklonale fluorescerende antistoffer. IntraPrep brukes for å klargjøre biologiske prøver for analyse med flytscyometri. Det har blitt optimert for å minimere den ikke-spesifikke fargingen i denne typen analyse (1,2,3,4).

PRINSIPP

Som et første trinn fikseres celler med reagens 1. Etter vasking fremkalles permeabiliteten med reagens 2 og gjenværende erytrocytter lyseres. I løpet av denne fasen settes cellene i kontakt med konjugerte monoklonale antistoffer som er spesifikke for intracellulære antigeniske determinanter. Leukocytene analyseres deretter ved bruk av flow-cytometri.

Demonstrasjonen av overflate-antigeniske determinanter forbli imidlertid mulig. I dette tilfellet inkuberes de spesifikke, konjugerte antistoffene før fiksering.

Flow-cytometeret måler lysdiffusjonen og fluorescensen til cellene. Dette muliggjør lokaliseringen av den interessante populasjonen innen det elektroniske vinduet som er definert på et histogram, som korrelerer den rettvinklede diffusjonen av lys (sidespredning eller SS) og diffusjonen av smalvinklet lys (Frem-spredning eller FS). Andre histogrammer som kombinerer to av de forskjellige parametrene som er tilgjengelige på cytometeret kan brukes som støtte i utløsingsfasen, avhengig av bruksområdet som er valgt av brukeren.

Fluorescensen i de avgrensede cellene analyseres for å skille de positivt fargede hendelsene fra de ufargede. Resultatene er uttrykt som en prosentandel positive hendelser i forhold til alle hendelser innhentet ved gatingen.

TILTENKT BRUKER

Dette produktet skal brukes av profesjonelle brukere på laboratorier.

PRØVER

Veneblod- eller benmargsprøver må tas ved bruk av sterile prøverør som inneholder EDTA-salt eller ACD eller heparin som antikoagulant.

Prøvene må oppbevares ved romtemperatur (18 – 25 °C) og må ikke ristes. Prøven må homogeniseres ved forsiktig risting før prøven tas.

Prøvene må analyseres innen 24 timer etter venepunksjon.

ADVARSEL OG FORHOLDSREGLER

1. Reagenset må ikke brukes etter utløpsdatoen.
2. Må ikke fryses.
3. Bør ikke utsettes for lys.
4. Unngå mikrobiell kontaminering av reagensene, ellers kan det gi feil resultater.
5. Reagens 1 inneholder formaldehyd. Formaldehyd er giftig og allergifremkallende. Det antas å være et kreftframkallende stoff.
6. Reagens 2 inneholder Natriumazid (NaN₃). Det må behandles med varsomhet. Må ikke inntas. Unngå all kontakt med hud, slimhinner og øyne. Videre kan natriumazid i et syremedium danne potensielt farlig hydrogenazid. Hvis det må kasseres, anbefales det at reagenset fortynnes i store mengder vann før det tømmes i avløpssystemet, slik at man unngår oppsamling av natriumazid i metallrør, og for å hindre eksplosjonsfare.
7. Alle blodprøver må betraktes som potensielt smittefarlige og må håndteres med forsiktighet (gjelder spesielt: bruk av vernehansker, laboratoriefrakk og vernebriller).
8. Pipetter aldri med munnen, og unngå at prøvene kommer i kontakt med huden, slimhinnene og øynene.

9. Blodprøverør og engangsmateriale som brukes til håndtering, skal kastes i beholdere beregnet for forbrenning.

10. Reagenser og avfall skal kastes i henhold til lokale krav.

GHS-FAREKLASSIFISERING

Reagens 1: Fiksasjon

FARE



H302	Farlig ved svelging.
H313	Kan være farlig ved hudkontakt
H314	Gir alvorlige etseskader på hud og øyne.
H317	Kan utløse en allergisk hudreaksjon.
H341	Mistenkes å kunne gi genetiske skader.
H350	Kan forårsake kreft.
H370	Forårsaker organskader.
P201	Innhent særskilt instruks før bruk.
P280	Bruk vernehansker, verneklær og vernebriller/ansiktsskjerm.
P303+P361+P353	VED HUDKONTAKT: Skyll/dusj huden med vann.
P305+P351+P338	VED ØYEKONTAKT: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser hvis dette kan gjøres lett. Fortsett å skylle.
P310	Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege. Metanol 1 - 2 % Formaldehyd 5 - 10 %



Sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på beckman.com/techdocs

OPPBEVARING OG STABILITET

IntraPrep må oppbevares ved 18 – 25 °C.

Stabilitet for lukket flaske: reagenset er stabilt i 517 dager.

Stabilitet for åpent flaske: reagenset er stabilt i 90 dager.

Se lot-spesifikt analysesertifikat på www.beckman.com.

TEGN PÅ FORRINGELSE

Endringer i reagensenes fysiske utseende kan være tegn på redusert kvalitet, og slike reagenser skal ikke brukes.

For ytterligere informasjon eller hvis produktet mottas skadet, kan Beckman Coulter kundeservice 800-742-2345 (USA og Canada) eller den lokale Beckman Coulter-representanten kontaktes.

INNHold

Natriumazid kan danne eksplosive blandinger i metalliske avløpsrør. Se NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (Fare for eksplosive azider) (16.8.76).

For å unngå mulig opphopning av azidforbindelser må avløpsrør skylles med vann etter avhending av uforynnet reagens. Avfallshåndtering av natriumazid må skje i samsvar med relevante lokale forskrifter.

NØDVENDIGE MATERIALER SOM IKKE FØLGER MED SETTET:

- Prøvetakingsrør og materiale nødvendig for prøvetaking.
- Automatiske pipetter med engangsspisser for 10, 20, 50, 100 og 500 µL.
- Hemolyserør av plast.
- Spesifikke monoklonale antistoffer (mAb).
- Negative kontroller.
- Leukocyt-fikseringsreagens. For eksempel: IOTest 3-fikseringsløsning (ref. A07800).

- Buffer (PBS: 0,01 M natriumfosfat; 0,145 M natriumklorid; pH 7,2).
- Sentrifuger.
- Automatisk omrører (vortekstype).
- Flytcytometer.

PROSEDYRE

A - Intracytoplasmisk farging

Antallet røde blodceller i prøven skal være lavere enn 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Fortynn i PBS om nødvendig.

Antall tilstedeværende leukocytter i prøven skal være mindre enn $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Tynn ut i PBS om nødvendig.

For hver prøve som analyseres, kan det i tillegg til prøverøret legges til ett kontrollrør hvor cellene blandes med tilstedeværelse av den negative kontrollen, samsvarende med den spesifikke farging som er valgt.

1. Tilsett 50 μL av testprøven i hvert rør.
2. Tilsett 100 μL reagens 1 i hvert rør. Vorteks kraftig umiddelbart etter hver tilsetning.
3. Innkuber i 15 minutter i romtemperatur (18 – 25 °C).
4. Tilsett 4 mL PBS i hvert rør.
5. Sentrifuger i 5 minutter ved 300 x g i romtemperatur.
6. Fjern supernatanten ved aspirasjon.
7. Tilsett 100 μL av reagens 2 i hvert rør. IKKE VORTEKS. La reagens 2 diffundere naturlig inn i cellepelleten.
8. Innkuber i 5 minutter i romtemperatur (18 – 25 °C) UTEN Å RYSTE.
9. Ryst langsomt for hånd i 2 - 3 sekunder.
10. Tilsett den nødvendige mengden mAb (som er spesifikk for en intracytoplasmatisk antigendeterminant) i hvert prøverør, og om nødvendig den riktige mengden negativ kontroll i hvert kontrollrør.
11. Ryst rør for rør forsiktig.
12. Inkuber i 15 minutter ved romtemperatur (18–25 °C), beskyttet mot lys.
13. Tilsett 4 mL PBS i hvert rør.
14. Sentrifuger i 5 minutter ved 300 x g i romtemperatur.
15. Fjern supernatanten ved aspirasjon og resuspender 0,5 eller 1 mL med IOTest 3 Fikserløsning (Ref. A07800) i sin arbeidskonsentrasjon (1X). Fikserte kan preparatene oppbevares mellom 2 og 8 °C utenfor sollys i 24 timer.

B - Intracytoplasmisk og membranøs farging

Antallet røde blodceller i prøven skal være lavere enn 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Fortynn med PBS om nødvendig.

Antallet leukocytter i prøven skal være lavere enn 5×10^3 per μL ($5 \times 10^9/\text{L}$). Fortynn med PBS om nødvendig.

For hver prøve som analyseres, kan det i tillegg til prøverøret legges til ett kontrollrør hvor cellene blandes med tilstedeværelse av den negative kontrollen, samsvarende med den spesifikke farging som er valgt.

1. Tilsett 50 μL av testprøven i hvert rør.
2. Tilsett den nødvendige mengden mAb (som er spesifikk for en membranøs antigendeterminant) i hvert prøverør, og tilsett om nødvendig den riktige mengden negativ kontroll i hvert kontrollrør.
3. Ryst rør for rør forsiktig.
4. Inkuber i 15 minutter ved romtemperatur (18–25 °C), beskyttet mot lys.
5. Tilsett 100 μL reagens 1 i hvert rør. Vorteks kraftig umiddelbart etter hver tilsetning.
6. Innkuber i 15 minutter i romtemperatur (18 – 25 °C).
7. Tilsett 4 mL PBS i hvert rør.
8. Sentrifuger i 5 minutter ved 300 x g i romtemperatur.
9. Fjern supernatanten ved aspirasjon.
10. Tilsett 100 μL av reagens 2 i hvert rør. IKKE VORTEKS. La reagens 2 diffundere naturlig inn i cellepelleten.
11. Innkuber i 5 minutter i romtemperatur (18 – 25 °C) UTEN Å RYSTE.
12. Ryst langsomt for hånd i 2 - 3 sekunder.
13. Tilsett den nødvendige mengden mAb (som er spesifikk for en intracytoplasmatisk antigendeterminant) i hvert prøverør, og om nødvendig den riktige mengden negativ kontroll i hvert kontrollrør.

14. Legg til 20 µL med isotypisk kontroll i hvert kontrollrør.
15. Ryst rør for rør forsiktig.
16. Inkuber i 15 minutter ved romtemperatur (18–25 °C), beskyttet mot lys.
17. Tilsett 4 mL PBS i hvert rør.
18. Sentrifuger i 5 minutter ved 300 x g i romtemperatur.
19. Fjern supernatanten ved aprasjon og resuspender 0,5 eller 1 mL med IOTest 3 Fikserløsning (Ref. A07800) i sin arbeidskonsentrasjon (1X). Fikserte kan preparatene oppbevares mellom 2 og 8 °C utenfor sollys i 24 timer.

YTELSE

Ytelsesdata er fremskaffet ved bruk av prosedyren som er beskrevet ovenfor på mindre enn 24 timer gamle blodprøver som tidligere er samlet i sterile rør med EDTA-salt som antikoagulant. Analysen utføres innen 2 timer etter immunfarging.

PREISJON

Prosentandel av positive verdier ble bestemt med fullblod og beinmarg. Hver prøve ble kjørt 4 ganger, to ganger om dagen i 1 dag på 2 instrumenter med 2 partier IntraPrep gjennomtrengelighetsreagens. Målinger (% positiv) ble foretatt på et Navios-flytscytopometer. Analyse ble utført basert på CLSI-metoden EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluering av presisjonsytelse ved kvantitative målemetoder).

Våre godkjenningkriterier er avhengige av antall positive hendelser som måles for hver populasjon:

- Hvis positiv hendelse < 1 500, VK < 15 %
- Hvis positiv hendelse > 1 500, VK < 10 %

Fullblod i EDTA:

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk renhet							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 8877							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk gjenvinning							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 8877							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC-intracytoplasmatisk farging på monocytter							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 1070							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidase-FITC-intracytoplasmatisk farging på granulocytter							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 13246							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Fullblod i HEPARIN:

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk renhet							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 6824							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk gjenvinning							
Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 6824							

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoksydase-FITC-intracytoplasmatisk farging på monocytter

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 961

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoksydase-FITC-intracytoplasmatisk farging på granulocytter

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 20742

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Fullblod i ACD:

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk renhet

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 12355

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk gjenvinning

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 12355

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoksydase-FITC-intracytoplasmatisk farging på monocytter

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 1483

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoksydase-FITC-intracytoplasmatisk farging på granulocytter

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 32715

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Beinmarg i EDTA:

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk renhet

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 8808

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranøs farging = lymfocytisk gjenvinning

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 8808

	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøringer	Innenfor samme kjøring	Total
--	-------------------	-------------------	--------------------	--------------	------------------	------------------------	-------

VK (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxydase-FITC-intracytoplasmatisk farging på monocytter

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 2212							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxydase-FITC-intracytoplasmatisk farging på granulocytter

Antall positive hendelser (gjennomsnitt) = 33181							
	Mellom operatører	Mellom cytometere	Innenfor samme lot	Mellom loter	Mellom kjøring	Innenfor samme kjøring	Total
VK (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RESULTATER	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LYMFOCYTTISK GJENVINNING OG RENHET

Lymfocytisk gjenvinning og renhet er vurdert i henhold til anbefalingene fra CDC (5). Blod fra 10 friske donorer ble tatt i EDTA, heparin og ACD, og 5 beinmargsprøver ble merket med en blanding av monoklonale antistoffer CD45-FITC og CD14-PE. De gjennomsnittlige verdiene for gjenvinning og renhet samt verdiområde er angitt i følgende tabeller:

Fullblod i EDTA		
Parameter	Gjenvinning	Renhet
Gjennomsnitt	93,6	89,7
Min./maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Fullblod i HEPARIN		
Parameter	Gjenvinning	Renhet
Gjennomsnitt	94,3	87,6
Min./maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Fullblod i ACD		
Parameter	Gjenvinning	Renhet
Gjennomsnitt	94,2	94,6
Min./maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Beinmarg i EDTA		
Parameter	Gjenvinning	Renhet
Gjennomsnitt	80,7	71,8
Min./maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

BEGRENSNINGER

- Flowcytometri kan gi falske resultater hvis cytometeret ikke har blitt justert nøyaktig, hvis fluorescenslekkasjer ikke er kompensert riktig, og hvis regionene ikke er nøyte plassert.
- Visse antigene determinanter kan være følsomme for formaldehyd eller saponine. Hvert laboratorium må validere vilkår for bruk av monoklonale antistoffer
- Nøyaktige og reproduerbare resultater vil oppnås så lenge de anvendte prosedyrene er i samsvar med det tekniske pakningsvedlegget og god laboratoriepraksis.
- Denne reagensen er optimalisert slik at det gir best signal / ikke-spesifikk signal ratio. Derfor er det viktig å forholde seg til forholdet mellom reagensvolum / antall leukocytter og erytrocytter i hver test.
- Ved hypercellularitet skal prøven fortynnes i PBS, slik at det oppnås færre enn 5×10^9 leukocytter/L og færre enn 6×10^{12} røde blodceller / L (6).
- Ved visse sykdomstilstander, for eksempel alvorlig nyresvikt eller hemoglobinopater, kan lyseringen av røde celler være langsom, ufullstendig eller til og med umulig. I dette tilfellet anbefales det å isolere mononukleære celler ved hjelp av en densitetsgradient (for eksempel Ficoll) før farging (7).

Se vedlegget for eksempler og referanser.

VAREMERKER

Beckman Coulter, den stiliserte logoen og vare- og servicemerkene til Beckman Coulter som er omtalt her, er varemerker eller registrerte varemerker som tilhører Beckman Coulter, Inc. i USA og andre land.

TILLEGGSINFORMASJON

For pasient/bruker/tredjepart i EU og land med identisk regelverk (EUs forordning nr. 2017/746 om in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr); hvis det har oppstått en alvorlig hendelse under bruk av dette utstyret, eller som et resultat av bruken, skal dette rapporteres til produsenten og/eller den autoriserte representanten samt til nasjonal myndighet.

REVISJONSHISTORIE

REVISJON AF:	Utgivelsesdato: Januar 2021
REVISJON AW:	
Oppdateringer skal overholde de globale merkingsreglene til Beckman Coulter og være i samsvar med krav iht. IVD-R (EU)2017/746:	
Innsatte avsnitt	Tiltenkt bruker, Presisjon, Lymfocytisk gjenvinning og renhet, Tilleggsinformasjon, Revisjonshistorie
Innsatt informasjon	Se avsnittene Advarsler og forholdsregler, Oppbevaring og stabilitet, Begrensninger
Oppdaterte avsnitt	Advarsler og forholdsregler, GHS-fareklassifisering, Oppbevaring og stabilitet, Tegn på forringelse, Prosedyre, Ytelse
Fjernede avsnitt	Reproduserbarhet innenfor laboratoriet

Symbolforklaring

Symbolordliste er tilgjengelig på beckman.com/techdocs (dokumentnummer B60062)

	Reagenssi 1	Reagenssi 2
	Kiinnitysaine	Permeabiliteettiaine
Koostumus	Neste	Neste
Vaikuttava aine	Formaldehydi	Saponiini
Tilavuus	5 ml	5 ml
Ampullien määrä	3 ampullia	3 ampullia
Tilavuus testiä kohti	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testiä; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml / testi

Diagnostiseen *In Vitro* -käyttöön

KÄYTTÖTARKOITUS

IntraPrep koostuu kahdesta käyttövalmiista reagenssista, jotka saavat aikaan läpäisevyyttä leukosyytien sytoplasisessa kalvossa, mikä mahdollistaa solunsisäisten ja -ulkoisten antigeenien determinanttien ilmentämisen monoklonaalisten fluoresoivien vasta-aineiden avulla. IntraPrepia käytetään biologisten näytteiden valmistamiseen analysointia varten virtausytometrialla. Se on optimoitu minimoimaan epäspesifinen värjäytyminen tässä analyysityypissä (1,2,3,4).

PERIAATE

Ensimmäisenä vaiheena solut kiinnitetään reagenssilla 1. Pesun jälkeen suoritetaan permeabilisointi reagenssilla 2 ja jäljelle jäävät erytrosyytit lyysataan. Tässä vaiheessa solut joutuvat kosketuksiin konjugoitujen monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa, jotka ovat spesifisiä solunsisäisille antigeenideterminanteille. Tämän jälkeen leukosyytit analysoidaan virtausytometrialla.

Pinta-antigeenien determinanttien ilmentäminen on kuitenkin edelleen mahdollista. Tässä tapauksessa kyseiset konjugoituidut monoklonaaliset vasta-aineet inkuboidaan ennen kiinnitystä.

Virtausytometri mittaa valonhajontaa ja solujen fluoresenssia. Sen avulla on mahdollista paikantaa kiinnostuksen kohteena oleva populaatio pylväskaavioon määritetyssä elektronisessa ikkunassa, jossa ortogonaalinen valonhajonta (sivusironta eli SS) vastaa kapean kulman valonhajontaa (eteenpäinsironta eli FS). Muita sytometrin kahta eri parametria yhdistäviä pylväskaavioita voidaan käyttää rajaamisvaiheen tukena käyttäjän valitseman sovelluksen mukaan.

Rajattujen solujen fluoresenssi analysoidaan, jotta positiivisesti värjäytyneet tapahtumat voidaan erottaa värjäytymättömistä tapahtumista. Tulokset ilmaistaan positiivisten tapahtumien prosenttimääränä suhteessa kaikkiin rajauksella kerättyihin tapahtumiin.

KÄYTTÖTARKOITUKSEN MUKAINEN KÄYTTÄJÄ

Tämä tuote on tarkoitettu ammattimaiseen laboratoriokäyttöön.

NÄYTTEET

Laskimoveri- tai luuydinnäytteet on otettava käyttäen steriilejä putkia, joissa on antikoagulanttina EDTA-suolaa, ACD:tä tai hepariinia.

Näytteet on säilytettävä huoneenlämmössä (18–25 °C), eikä niitä saa ravistaa. Näyte on homogenoitava sekoittamalla hellävaraisesti ennen testinäytteen ottamista.

Näytteet on analysoitava 24 tunnin sisällä laskimopunktiosta.

VAROITUS JA VAROTOIMET

1. Älä käytä reagenssia viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
2. Ei saa jäättyä.
3. Minimoi altistuminen valolle.
4. Vältä reagenssien mikrobikontaminaatiota, muutoin vaarana ovat virheelliset tulokset.
5. Reagenssi 1 sisältää formaldehydiä. Formaldehydi on toksista ja allergeenistä. Sitä pidetään karsinogeenisenä aineena.
6. Reagenssi 2 sisältää natriumatsidia (NaN₃). Sitä on käsiteltävä varoen. Sitä ei saa niellä, ja sen joutumista iholle, limakalvoille ja silmiin on vältettävä. Lisäksi happamassa liuoksessa natriumatsidi voi muodostaa mahdollisesti vaarallista hydratoehappoa. Jos reagenssi on hävitettävä, se on suositeltavaa laimentaa suureen vesimäärään ennen sen kaatamista viemäriin, jotta natriumatsidia ei pääse kertymään metalliputkiin ja vältetään räjähdysvaara.
7. Kaikkia verinäytteitä on pidettävä mahdollisesti tartuntavaarallisina, ja niitä on käsiteltävä varovaisesti (erityisesti on muistettava suojakäsineiden, -pukujen ja -lasien käyttö).
8. Älä koskaan pipetoi suulla ja vältä näytteiden kaikkea kosketusta ihoon, limakalvoihin ja silmiin.

9. Veriputket ja käsittelyyn käytetyt kertakäyttöiset materiaalit on hävitettävä poltettaviksi tarkoitetuissa ad hoc -astioissa.

10. Reagenssit ja jätteet on hävitettävä paikallisten vaatimusten mukaisesti.

GHS-VAARALUOKITUS

Reagenssi 1: Kiinnitys

VAARA



H302

Haitallista nieltynä.

H313

Voi olla haitallista ihokosketuksessa.

H314

Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa.

H317

Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion.

H341

Epäillään aiheuttavan perimävaurioita.

H350

Aiheuttaa syöpäsairauden vaaraa.

H370

Vahingoittaa elimiä.

P201

Lue erityisohjeet ennen käyttöä.

P280

Käytettävä suojakäsineitä, suojavaatetusta ja suojalaseja tai kasvosuojusta.

P303+P361+P353

JOS IHOLLA (tai hiuksissa): huuhtelee iho vedellä.

P305+P351+P338

JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos tehtävissä helposti. Jatka huuhtomista.

P310

Ota välittömästi yhteys

MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin.

Metanoli 1 - 2 %

Formaldehydi 5 - 10 %



Käyttöturvallisuustiedote on saatavana osoitteessa beckman.com/techdocs

SÄILYTYS JA STABILITEETTI

IntraPrep säilytetään 18–25 °C:n lämpötilassa.

Suljetun ampullin stabiilitetti: reagenssi on stabiili 517 päivän ajan.

Avatun ampullin stabiilitetti: reagenssi on stabiili 90 päivän ajan.

Katso eräkohtainen analyysitodistus osoitteesta www.beckman.com.

MERKIT PILAANTUMISESTA

Mahdolliset muutokset reagenssin fyysisessä ulkonäössä voivat viitata huonontumiseen, eikä reagenssia saa tällöin käyttää.

Jos tarvitset lisätietoja tai jos sait vahingoittuneen tuotteen, soita Beckman Coulter -asiakaspalveluun numeroon 800 742 2345 (USA ja Kanada) tai ota yhteyttä Beckman Coulterin paikalliseen edustajaan.

SISÄLTÖ

Natriumatsidi-säilöntäaine saattaa muodostaa räjähtäviä yhdisteitä metallisissa viemäriputkissa. Katso NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (16.08.1976).

Huuhtelee viemäriputket vedellä laimentamattoman reagenssin poiston jälkeen mahdollisen atsidiyhdisteiden kerääntymisen estämiseksi. Hävitä natriumatsidi asianmukaisten paikallismääräysten mukaisesti.

TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOITA EI TOIMITETA SARJAN MUKANA:

- Näytteenottoon tarvittavat näytteenottoputket ja materiaalit.
- Automaattiset pipetit, joissa kertakäyttökärjet 10, 20, 50, 100 ja 500 µl.
- Muoviset hemolyysiputket.
- Spesifiset monoklonaliset vasta-aineet (mAb).

- Negatiiviset kontrollit.
- Leukosyyttien kiinnitysreagenssi. Esimerkiksi: IOTest 3 -fiksatiiviliuos (viite A07800).
- Puskuri (PBS: 0,01 M natriumfosfaattia, 0,145 M natriumkloridia, pH 7,2).
- Sentrifugi.
- Automaattinen sekoitin (Vortex-/pyörretyyppinen).
- Virtaussytometri.

MENETTELY

A – Intrasytoplasminen värjäys

Näytteen punasolumäärän on oltava pienempi kuin 6×10^6 solua/ μ l (6×10^{12} solua/l). Laimenna tarvittaessa PBS:llä.

Näytteen leukosyyttimäärän on oltava pienempi kuin 5×10^3 / μ l (5×10^9 /l). Laimenna tarvittaessa PBS:llä.

Jokaiselle analysoidulle näytteelle voidaan testiputken lisäksi käyttää yhtä kontrolliputkea, jossa solut sekoitetaan valittua värjäystä vastaavan negatiivisen kontrollin kanssa.

1. Lisää 50 μ l testinäytettä kuhunkin putkeen.
2. Lisää 100 μ l reagenssia 1 kuhunkin putkeen. Sekoita vorteksilla voimakkaasti ja välittömästi jokaisen lisäyksen jälkeen.
3. Inkuboi 15 minuuttia huoneenlämmössä (18–25 °C).
4. Lisää 4 ml PBS:ää jokaiseen putkeen.
5. Sentrifugoi 300 x g 5 minuutin ajan huoneenlämmössä.
6. Poista supernatantti aspiroimalla.
7. Lisää 100 μ l reagenssia 2 kuhunkin putkeen. ÄLÄ SEKOITA VORTEKSILLA, jätä reagenssi 2 sekoittumaan luonnollisesti solupellettiin.
8. Inkuboi 5 minuutin ajan huoneenlämmössä (18–25 °C), ÄLÄ RAVISTA.
9. Ravista hitaasti käsin 2–3 sekuntia.
10. Lisää kuhunkin testiputkeen tarvittava määrä monoklonaalista vasta-ainetta (mAb) (joka on spesifistä intrasytoplasmiselle antigeenideterminantille) ja tarvittaessa kuhunkin kontrolliputkeen soveltuva määrä negatiivista kontrollia.
11. Sekoita varovaisesti pyörresekoittimella putki kerrallaan.
12. Inkuboi 15 minuuttia huoneenlämmössä (18–25 °C) valolta suojattuna.
13. Lisää 4 ml PBS:ää jokaiseen putkeen.
14. Sentrifugoi 300 x g 5 minuutin ajan huoneenlämmössä.
15. Poista supernatantti aspiroimalla ja suspendoi solupelletti uudelleen käyttämällä 0,5 tai 1 ml IOTest 3 -fiksatiiviliuosta (viite A07800) sen työskentelypitoisuudella (1-kertainen). Näin kiinnitetyt valmisteet voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa ja valolta suojattuna 24 tuntia.

B – Intrasytoplasminen ja membraaninen värjäys

Näytteen punasolumäärän on oltava pienempi kuin 6×10^6 solua/ μ l (6×10^{12} solua/l). Laimenna tarvittaessa PBS:llä.

Näytteen leukosyyttimäärän on oltava pienempi kuin 5×10^3 / μ l (5×10^9 /l). Laimenna tarvittaessa PBS:llä.

Jokaiselle analysoidulle näytteelle voidaan testiputken lisäksi käyttää yhtä kontrolliputkea, jossa solut sekoitetaan valittua värjäystä vastaavan negatiivisen kontrollin kanssa.

1. Lisää 50 μ l testinäytettä kuhunkin putkeen.
2. Lisää kuhunkin testiputkeen tarvittava määrä monoklonaalista vasta-ainetta (mAb) (joka on spesifistä kalvoantigeenideterminantille) ja tarvittaessa lisää kuhunkin kontrolliputkeen soveltuva määrä negatiivista kontrollia.
3. Sekoita varovaisesti pyörresekoittimella putki kerrallaan.
4. Inkuboi 15 minuuttia huoneenlämmössä (18–25 °C) valolta suojattuna.
5. Lisää 100 μ l reagenssia 1 kuhunkin putkeen. Sekoita vorteksilla voimakkaasti ja välittömästi jokaisen lisäyksen jälkeen.
6. Inkuboi 15 minuuttia huoneenlämmössä (18–25 °C).
7. Lisää 4 ml PBS:ää jokaiseen putkeen.
8. Sentrifugoi 300 x g 5 minuutin ajan huoneenlämmössä.
9. Poista supernatantti aspiroimalla.

10. Lisää 100 µl reagenssia 2 kuhunkin putkeen. ÄLÄ SEKOITA VORTEKSILLA, jätä reagenssi 2 sekoittumaan luonnollisesti solupellettiin.
11. Inkuboi 5 minuutin ajan huoneenlämmössä (18–25 °C), ÄLÄ RAVISTA.
12. Ravista hitaasti käsin 2–3 sekuntia.
13. Lisää kuhunkin testiputkeen tarvittava määrä monoklonaalista vasta-ainetta (mAb) (joka on spesifistä intrasytoplasmiselle antigeenideterminantille) ja tarvittaessa kuhunkin kontrolliputkeen soveltuva määrä negatiivista kontrollia.
14. Lisää jokaiseen kontrolliputkeen 20 µl isotyyppistä kontrollia.
15. Sekoita varovaisesti pyörresekoittimella putki kerrallaan.
16. Inkuboi 15 minuuttia huoneenlämmössä (18–25 °C) valolta suojattuna.
17. Lisää 4 ml PBS:ää jokaiseen putkeen.
18. Sentrifugoi 300 x g 5 minuutin ajan huoneenlämmössä.
19. Poista supernatantti aspiroimalla ja suspendoi solupelletti uudelleen käyttämällä 0,5 tai 1 ml IOTest 3 -fiksatiiviliuosta (viite A07800) sen työskentelypitoisuudella (1-kertainen). Näin kiinnitetyt valmistet voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa ja valolta suojattuna 24 tuntia.

SUORITUSKYKY

Suorituskykytiedot saadaan edellä kuvatulla menetelmällä käyttämällä alle 24 tunnin ikäisistä näytteistä, jotka on aiemmin kerätty steriileihin putkiin, joissa antikoagulanttina on EDTA-suola. Analyysi suoritetaan 2 tunnin kuluessa immunovärjäyksestä.

TARKKUUS

Prosentuaaliset positiiviset arvot määritettiin käyttämällä kokoveria ja luuydintä. Jokainen näyte käsiteltiin 4 kertaa, kahdesti päivässä 1 päivänä 2:ssa eri laitteessa käyttämällä 2:ta eri erää IntraPrep-permeabilisointireagenssia. Mittaukset (% positiivisia) tehtiin Navios-virtausytometrillä. Analyysi tehtiin perustuen CLSI-menetelmään EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kvantitatiivisten mittausmenetelmien tarkkuussuorituskyvyn arviointi).

Hyväksyntäkriteerimme on riippuvainen kussakin populaatiossa mitattujen positiivisten tapahtumien määrästä:

- Jos tapahtuma on positiivinen < 1 500, CV < 15 %
- Jos tapahtuma on positiivinen > 1 500, CV < 10 %

Kokoveri, EDTA:

CD45/CD14-kalvovärjäys = lymfosyyttinen puhtaus							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 8877							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 kalvovärjäys = lymfosyyttinen palautuminen							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 8877							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monosyyttien intrasytoplasmisen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 1070							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granulosyyttien intrasytoplasmisen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 13246							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Kokoveri, HEPARIINI:

CD45/CD14-kalvovärjäys = lymfosyyttinen puhtaus							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 6824							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 kalvovärjäys = lymfosyyttinen palautuminen							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 6824							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monosyyttien intrasytoplasminen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 961							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granulosyyttien intrasytoplasminen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 20742							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Kokoveri, ACD:

CD45/CD14-kalvovärjäys = lymfosyyttinen puhtaus							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 12355							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 kalvovärjäys = lymfosyyttinen palautuminen							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 12355							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monosyyttien intrasytoplasminen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 1483							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granulosyyttien intrasytoplasminen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 32715							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Luuydin, EDTA:

CD45/CD14-kalvovärjäys = lymfosyyttinen puhtaus							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 8808							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 kalvovärjäys = lymfosyyttinen palautuminen							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 8808							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monosyyttien intrasytoplasminen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 2212							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granulosyyttien intrasytoplasminen värjäys anti-myeloperoksidaasi-FITC:llä							
Positiivisten tapahtumien määrä (keskiarvo) = 33181							
	Käyttäjien välinen	Sytometrin sisäinen	Erän sisäinen	Erien välinen	Ajojen välinen	Ajon sisäinen	Yhteensä
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
TULOKSET	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LYMFOSYYTTINEN PUHTAUS JA PALAUTUMINEN

Lymfosyyttien puhtautta ja palautumista on arvioitu CDC:n suositusten mukaisesti (5). Kymmeneltä terveeltä luovuttajalta EDTA:han, hepariiniin ja ACD:hen kerätyt verinäytteet ja viisi luuydinnäytettä merkittiin monoklonaalisten CD45-FITC- ja CD14-PE-vasta-aineiden seoksella. Palautumisen ja puhtauden keskiarvot ja vaihteluvälit esitetään seuraavissa taulukoissa:

Kokoveri, EDTA:		
Parametri	Palautuminen	Puhtaus
Keskiarvo	93,6	89,7
Min./maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Kokoveri, HEPARIINI:		
Parametri	Palautuminen	Puhtaus
Keskiarvo	94,3	87,6
Min./maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Kokoveri, ACD:		
Parametri	Palautuminen	Puhtaus
Keskiarvo	94,2	94,6
Min./maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Luuydin, EDTA		
Parametri	Palautuminen	Puhtaus
Keskiarvo	80,7	71,8
Min./maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

RAJOITUKSET

1. Virtaussytometrialla saadut tulokset voivat olla virheellisiä, jos sytometri on kohdistettu epätarkasti, jos fluoresenssivuotoja ei ole kompensoitu oikein ja jos alueita ei ole sijoitettu tarkasti.
2. Tietyt antigeeniset determinantit voivat olla herkkiä formaldehydille tai saponiinille. Jokaisen laboratorion on validoitava monoklonaalisten vasta-aineiden käyttöehdot.
3. Tulokset oivat tarkkoja ja toistettavissa, kunhan käytetyt menetelmät ovat teknisen selosteen mukaisia ja noudattavat hyviä laboratoriokäytäntöjä.
4. Tämä reagenssi on optimoitu siten, että saadaan paras spesifisen ja epäspesifisen signaalin suhde. Siksi on tärkeää noudattaa reagenssin tilavuuden / leukosyyttien ja erytrosyyttien määrän suhdetta jokaisessa testissä.
5. Jos kyseessä on hypersellulaarisuus, laimenna näyte PBS:ään siten, että saat pitoisuudeksi alle 5×10^9 leukosyyttiä/l ja alle 6×10^{12} punasolua/l (6).
6. Tietyissä sairaustiloissa, kuten vaikeassa munuaisten vajaatoiminnassa tai hemoglobiinopatioissa, punasolujen hajoaminen voi olla hidasta, epätäydellistä tai jopa mahdotonta. Tässä tapauksessa yksitumaiset solut on suositeltavaa eristää käyttämällä tiheysgradienttia (esimerkiksi Ficoll) ennen värjäystä (7).

Katso esimerkkejä ja viitteitä liitteestä.

TAVARAMERKIT

Beckman Coulter, tyylitelty logo ja tässä mainitut Beckman Coulter -tuotteiden ja palveluiden merkit ovat Beckman Coulter, Inc:in tavaramerkkejä tai rekisteröityjä tavaramerkkejä Yhdysvalloissa ja muissa maissa.

LISÄTIETOJA

Potilaalle / käyttäjälle / kolmannelle osapuolelle Euroopan unionin alueella ja maissa, joissa on samanlainen sääntelyjärjestelmä (in vitro -diagnostiikkaan tarkoitettuja lääkinnällisiä laitteita koskeva asetus 2017/746/EU): jos tämän laitteen käytön aikana tai sen käytön seurauksena on tapahtunut vakava tapahtuma, ilmoita siitä valmistajalle ja/tai valmistajan valtuutetulle edustajalle sekä kansalliselle viranomaiselle.

TARKISTUSHISTORIA

VERSIO AF:	Julkaisupäivä: Tammikuu 2021
VERSIO AW:	
Päivitetty noudattamaan Beckman Coulterin maailmanlaajuisia merkintämenettelyä ja IVD-R (EU)2017/746 -standardin vaatimuksia:	
Lisätyt osat	Käyttötarkoituksen mukainen käyttäjä, Tarkkuus, Lymfosyyttinen palautuminen ja puhtaus, Lisätietoja, Tarkistushistoria
Lisätyt tiedot	Katso osiot Varoitus ja varotoimet, Säilytys ja stabiiliteetti, Rajoitukset
Päivitetyt osat	Varoitus ja varotoimet, GHS-vaaraluokitus, Säilytys ja stabiiliteetti, Merkit pilaantumisesta, Menettely, Suorituskyky
Poistettut osat	Laboratorionsisäinen toistettavuus

Symboliluettelo

Symbolisanasto on saatavana osoitteessa beckman.com/techdocs (asiakirjan numero B60062)

	Αντιδραστήριο 1	Αντιδραστήριο 2
	Στερεωτικό διάλυμα	Διάλυμα διαπερατότητας
Μορφή	Υγρή	Υγρή
Δραστική ουσία	Φορμαλδεΰδη	Σαπωνίνη
ΤΟΜΟΣ	5 mL	5 mL
Αριθμός φιαλιδίων	3 φιαλίδια	3 φιαλίδια
Όγκος ανά δοκιμασία	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 δοκιμασίες, 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / δοκιμασία

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το IntraPrep περιλαμβάνει δύο αντιδραστήρια έτοιμα προς χρήση που επιτρέπουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των λευκοκυττάρων για την έκφραση, μέσω φθορίζοντων μονοκλωνικών αντισωμάτων, ενδοκυτταρικών αντιγονικών καθοριστών. Το IntraPrep χρησιμοποιείται για την προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Έχει βελτιστοποιηθεί για να ελαχιστοποιεί τις μη εξειδικευμένες σημάσεις σε αυτού του είδους τις αναλύσεις (1,2,3,4).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα κύτταρα στερεώνονται σε πρώτη φάση με το αντιδραστήριο 1. Μετά από πλύση, γίνονται διαπερατά με το αντιδραστήριο 2 και λύση των ερυθρών κυττάρων. Σε αυτό το βήμα, τα κύτταρα έρχονται σε επαφή με τα συζευγμένα μονοκλωνικά αντισώματα, εξειδικευμένα των ενδοκυτταρικών αντιγονικών καθοριστών. Μετά, τα λευκοκύτταρα αναλύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Όστος παραμένει δυνατή η έκφραση επιφανειακών αντιγονικών καθοριστών. Σε αυτή την περίπτωση, τα εξειδικευμένα συζευγμένα μονοκλωνικά αντισώματα επωάζονται πριν από το στάδιο στερεότητας.

Ο κυτταρομετρικής 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 ιστογράμμο 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 οριοθετημένων κυττάρων αναλύεται προκειμένου να είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των θετικά σημασμένων συμβάντων και των μη σημασμένων συμβάντων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό των θετικών συμβάντων σε σχέση με το σύνολο των συμβάντων που ελήφθησαν από την οριοθέτηση.

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟΣ ΧΡΗΣΤΗΣ

Αυτό το προϊόν προορίζεται για επαγγελματική εργαστηριακή χρήση.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα δείγματα φλεβικού αίματος ή μυελού των οστών πρέπει να διατηρούνται σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιέχουν άλας EDTA ή ACD ή ηπαρίνη 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.

Τα δείγματα πρέπει να αναλύονται εντός 24 ωρών από τη φλεβοκέντηση.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Μη χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης.
2. Μην καταψύχετε.
3. Ελαχιστοποιήστε την έκθεση στο φως.
4. Αποφύγετε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διαφορετικά ενδέχεται να προκύψουν ψευδή αποτελέσματα.
5. Το αντιδραστήριο 1 περιέχει φορμαλδεΰδη. Η φορμαλδεΰδη είναι τοξική και αλλεργιογόνος. Θεωρείται καρκινογόνος παράγοντας.
6. Το αντιδραστήριο 2 περιέχει αζίδιο του νατρίου (NaN₃). Πρέπει να το χειρίζεστε 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. Πρέπει να θεωρείτε όλα τα δείγματα αίματος δυνητικά μολυσματικά και να τα χειρίζεστε με προσοχή (ειδικότερα: να φοράτε προστατευτικά γάντια, ποδιές και γυαλιά).
8. Μην χρησιμοποιείτε ποτέ πιπέτα με το στόμα και αποφεύγετε κάθε επαφή των δειγμάτων με το δέρμα, τους βλεννογόνους και τα μάτια.
9. Τα σωληνάρια αίματος και το υλικό μίας χρήσης που χρησιμοποιούνται για τον χειρισμό πρέπει να απορρίπτονται σε ειδικά δοχεία που προορίζονται για αποτέφρωση.
10. Τα αντιδραστήρια και τα απόβλητα πρέπει να απομακρύνονται σύμφωνα με τις τοπικές απαιτήσεις.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ GHS

Αντιδραστήριο 1:
Σταθεροποίηση

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



H302

Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.

H313

Ενδέχεται να είναι επιβλαβές κατά την επαφή με το δέρμα.

H314

Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες.

H317

Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.

H341

Ύποπτο για πρόκληση γενετικών ελαττωμάτων.

H350

Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

H370

Προκαλεί βλάβες στα όργανα.

P201

Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

P280

Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.

P303+P361+P353

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): ξεπλύντε την επιδερμίδα με νερό.

P305+P351+P338

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

P310

Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.

Μεθανόλη 1 - 2%

Φορμαλδεΐδη 5 - 10%



Το Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση beckman.com/techdocs

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Το IntraPrep διατηρείται στους 18-25 °C.

Σταθερότητα κλειστού φιαλιδίου: το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για 517 ημέρες.

Σταθερότητα ανοιχτού φιαλιδίου: το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για 90 ημέρες.

Δείτε το ειδικό για την παρτίδα πιστοποιητικό ανάλυσης στη διεύθυνση www.beckman.com.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ

Οποιαδήποτε μεταβολή στην εμφάνιση των αντιδραστηρίων είναι πιθανό να υποδεικνύει αλλοίωση και το αντιδραστήριο δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται.

Για επιπλέον πληροφορίες ή σε περίπτωση παραλαβής ελαττωματικού προϊόντος, επικοινωνήστε με την υπηρεσία εξυπηρέτησης πελατών της Beckman Coulter στο 800-742-2345 (για ΗΠΑ και Καναδά) ή με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Beckman Coulter.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Το συντηρητικό αζιδίου του νατρίου μπορεί να σχηματίσει εκρηκτικές ενώσεις στους μεταλλικούς αποχετευτικούς αγωγούς. Δείτε το ενημερωτικό δελτίο του NIOSH: Explosive Azide Hazard (Κίνδυνος έκρηξης αζιδίου) (16/8/76)

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

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ:

- Σωλήνες δειγματοληψίας και υλικό που είναι απαραίτητο για τη δειγματοληψία.
- Αυτόματες πιπέττες και ειδικά ράμφη μιας χρήσης για τη λήψη ποσοτήτων όγκου 10, 20, 50, 100 και 500 μL .
- Πλαστικά σωληνάρια αιμόλυσης.
- Εξειδικευμένα μονοκλωνικά αντισώματα (MA).
- Αρνητικοί έλεγχοι.
- Αντιδραστήριο μονιμοποίησης λευκοκυττάρων. Για παράδειγμα: Διάλυμα μονιμοποίησης IOTest 3 (Ref. A07800).
- Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS: 0,01 M φωσφορικό νάτριο, 0,145 M χλωριούχο νάτριο, pH 7,2).
- Φυγόκεντρος.
- Αυτόματος αναδευτήρας (τύπου περιδίνησης).
- Κυτταρόμετρο ροής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A - Ενδοκυτταροπλασματική σήμανση

Η ποσότητα των ερυθρών κυττάρων που βρίσκονται στο δείγμα πρέπει να είναι κατώτερη των 6×10^6 ανά μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Αραιώστε αν χρειάζεται με PBS.

Η ποσότητα των λευκοκυττάρων που βρίσκονται στο δείγμα πρέπει να είναι κατώτερη των $5 \times 10^9/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Αραιώστε αν χρειάζεται με PBS.

Για κάθε δείγμα που αναλύεται, εκτός του σωληναρίου εξέτασης, μπορεί να προστεθεί ένα σωληνάριο μάρτυρα μέσα στο οποίο αναμειγνύονται τα κύτταρα παρουσία του αρνητικού μάρτυρα, που αντιστοιχεί στην ειδική χρώση που επιλέχθηκε.

1. Προσθέστε 50 μL του εξεταζόμενου δείγματος σε κάθε σωληνάριο.
2. Προσθέστε 100 μL αντιδραστήριου 1 σε κάθε σωληνάριο. Περιδίνηστε έντονα αμέσως μετά από κάθε προσθήκη.
3. Επώαστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($18 - 25^\circ\text{C}$).
4. Προσθέστε 4 mL PBS σε κάθε σωληνάριο.
5. Φυγοκεντρίστε στα $300 \times g$ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Αφαιρέστε το υπερκείμενο με αναρρόφηση.
7. Προσθέστε 100 μL του αντιδραστήριου 2 σε κάθε σωληνάριο. ΜΗΝ ΠΕΡΙΔΙΝΙΖΕΤΕ, αφήστε το αντιδραστήριο 2 να διαχυθεί με φυσικό τρόπο στο κυτταρικό ίζημα.
8. Επώαστε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($18 - 25^\circ\text{C}$) ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΑΝΑΚΙΝΗΣΕΤΕ ΜΕ VORTEX.
9. Ανακινήστε ελαφρά με το χέρι για 2 με 3 δευτερόλεπτα.
10. Προσθέστε την απαραίτητη ποσότητα mAb (ειδικά για έναν ενδοκυτταροπλασματικό αντιγονικό προσδιοριστικό παράγοντα) σε κάθε σωληνάριο εξέτασης και, εάν είναι απαραίτητο, την κατάλληλη ποσότητα του αρνητικού μάρτυρα σε κάθε σωληνάριο μάρτυρα.
11. Ανακινήστε με vortex κάθε σωλήνα ξεχωριστά.
12. Επώαστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25^\circ\text{C}$) λεπτά προστατευμένο από το φως.
13. Προσθέστε 4 mL PBS σε κάθε σωληνάριο.
14. Φυγοκεντρίστε στα $300 \times g$ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
15. Απαλλαχθείτε από το υπερκείμενο διάλυμα μέσω αναρρόφησης και εναιωρήστε ξανά το κυτταρικό ίζημα σε 0,5 mL ή 1 mL Στερεωτικού Διαλύματος IOTest 3 (Κωδ. A07800) στη συγκέντρωση χρήσης του (1X). Τα παρασκευάσματα που στερεώθηκαν με αυτό τον τρόπο διατηρούνται μεταξύ 2 και 8°C και μακριά από εστίες φωτός για 24 ώρες.

B - Ενδοκυτταροπλασματική και μεμβρανική σήμανση

Η ποσότητα των ερυθρών κυττάρων που βρίσκονται στο δείγμα πρέπει να είναι κατώτερη των 6×10^6 ανά μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Αραιώστε αν χρειάζεται με PBS.

Η ποσότητα των λευκοκυττάρων που βρίσκονται στο δείγμα πρέπει να είναι κατώτερη των $5 \times 10^9/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Αραιώστε αν χρειάζεται με PBS.

Για κάθε δείγμα που αναλύεται, εκτός του σωληναρίου εξέτασης, μπορεί να προστεθεί ένα σωληνάριο μάρτυρα μέσα στο οποίο αναμειγνύονται τα κύτταρα παρουσία του αρνητικού μάρτυρα, που αντιστοιχεί στην ειδική χρώση που επιλέχθηκε.

1. Προσθέστε 50 μL του εξεταζόμενου δείγματος σε κάθε σωληνάριο.
2. Προσθέστε την απαραίτητη ποσότητα mAb (ειδικά για έναν μεμβρανικό αντιγονικό προσδιοριστικό παράγοντα) σε κάθε σωληνάριο εξέτασης και, εάν απαιτείται, προσθέστε την κατάλληλη ποσότητα αρνητικού μάρτυρα σε κάθε σωληνάριο μάρτυρα.
3. Ανακινήστε με vortex κάθε σωλήνα ξεχωριστά.
4. Επώαστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25^\circ\text{C}$) λεπτά προστατευμένο από το φως.
5. Προσθέστε 100 μL αντιδραστηρίου 1 σε κάθε σωληνάριο. Περιδινήστε έντονα αμέσως μετά από κάθε προσθήκη.
6. Επώαστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($18 - 25^\circ\text{C}$).
7. Προσθέστε 4 mL PBS σε κάθε σωληνάριο.
8. Φυγοκεντρίστε στα $300 \times g$ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
9. Αφαιρέστε το υπερκείμενο με αναρρόφηση.
10. Προσθέστε 100 μL του αντιδραστηρίου 2 σε κάθε σωληνάριο. ΜΗΝ ΠΕΡΙΔΙΝΙΖΕΤΕ, αφήστε το αντιδραστήριο 2 να διαχυθεί με φυσικό τρόπο στο κυτταρικό ίζημα.
11. Επώαστε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($18 - 25^\circ\text{C}$) ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΑΝΑΚΙΝΗΣΕΤΕ ΜΕ VORTEX.
12. Ανακινήστε ελαφρά με το χέρι για 2 με 3 δευτερόλεπτα.
13. Προσθέστε την απαραίτητη ποσότητα mAb (ειδικά για έναν ενδοκυτταροπλασματικό αντιγονικό προσδιοριστικό παράγοντα) σε κάθε σωληνάριο εξέτασης και, εάν είναι απαραίτητο, την κατάλληλη ποσότητα του αρνητικού μάρτυρα σε κάθε σωληνάριο μάρτυρα.
14. Προσθέστε στο δοκιμαστικό σωλήνα 20 μL ισοτυπικού ελέγχου.
15. Ανακινήστε με vortex κάθε σωλήνα ξεχωριστά.
16. Επώαστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25^\circ\text{C}$) λεπτά προστατευμένο από το φως.
17. Προσθέστε 4 mL PBS σε κάθε σωληνάριο.
18. Φυγοκεντρίστε στα $300 \times g$ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
19. Απαλλαχθείτε από το υπερκείμενο διάλυμα μέσω αναρρόφησης και εναιωρήστε ξανά το κυτταρικό ίζημα σε 0,5 mL ή 1 mL Στερεωτικού Διαλύματος IOTest 3 (Κωδ. A07800) στη συγκέντρωση χρήσης του (1X). Τα παρασκευάσματα που στερεώθηκαν με αυτό τον τρόπο διατηρούνται μεταξύ 2 και 8°C και μακριά από εστίες φωτός για 24 ώρες.

ΑΠΟΔΟΣΗ

Τα δεδομένα απόδοσης λαμβάνονται με χρήση της διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω σε δείγματα αίματος ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών που συλλέχθηκαν προηγουμένως σε αποστειρωμένα σωληνάκια με άλας EDTA ως αντιπηκτικό. Η ανάλυση εκτελείται εντός 2 ωρών από την ανοσοχρώση.

ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Οι ποσοστιαίες θετικές τιμές προσδιορίστηκαν με χρήση ολικού αίματος και μυελού των οστών. Κάθε δείγμα αναλύθηκε 4 φορές, δύο φορές την ημέρα για 1 ημέρα σε 2 όργανα με χρήση 2 παρτίδων αντιδραστηρίου σταθεροποίησης IntraPrep. Οι μετρήσεις (% θετικών) πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής Navios. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Αξιολόγηση της απόδοσης ακρίβειας για μεθόδους ποσοτικής μέτρησης).

Τα κριτήρια έγκρισης εξαρτώνται από τον αριθμό των θετικών συμβάντων που μετρώνται για κάθε πληθυσμό:

- Σε περίπτωση θετικού συμβάντος <1.500 , $<15\%$ CV
- Σε περίπτωση θετικού συμβάντος >1.500 , $<10\%$ CV

EDTA ολικού αίματος:

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = Λεμφοκυτταρική καθαρότητα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 8877							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο

CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = λεμφοκυτταρική ανάκτηση							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 8877							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε μονοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 1070							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε κοκκιοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 13246							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ΗΠΑΡΙΝΗ ολικού αίματος:

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = Λεμφοκυτταρική καθαρότητα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 6824							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = λεμφοκυτταρική ανάκτηση							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 6824							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε μονοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 961							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε κοκκιοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 20742							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

AXN ολικού αίματος:

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = Λεμφοκυτταρική καθαρότητα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 12355							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = λεμφοκυτταρική ανάκτηση							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 12355							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε μονοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 1483							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε κοκκιοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 32715							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EDTA μυελού των οστών:

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = Λεμφοκυτταρική καθαρότητα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 8808							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Μεμβρανική χρώση CD45/CD14 = λεμφοκυτταρική ανάκτηση							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 8808							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε μονοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 2212							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ενδοκυτταροπλασματική χρώση με αντι-μυελοϋπεροξειδάση-FITC σε κοκκιοκύτταρα							
Αριθμός θετικών συμβάντων (μέση τιμή) = 33181							
	Μεταξύ χειριστών	Μεταξύ κυτταρόμετρων	Εντός παρτίδας	Μεταξύ παρτίδων	Μεταξύ αναλύσεων	Εντός ανάλυσης	Σύνολο
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Η λεμφοκυτταρική καθαρότητα και ανάκτηση έχουν αξιολογηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του CDC (5). Το αίμα 10 υγιών δοτών που υποβλήθηκαν σε δειγματοληψία σε EDTA, ηπαρίνη και AXN και 5 δείγματα μυελού των οστών επισημάνθηκαν με ένα μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων CD45-FITC και CD14-PE. Οι μέσες τιμές ανάκτησης και καθαρότητας, καθώς και το εύρος τιμών, παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες:

EDTA ολικού αίματος		
Παράμετρος	Ανάκτηση	Καθαρότητα
Μέσος όρος	93,6	89,7
Ελάχ./Μέγ.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

ΗΠΑΡΙΝΗ ολικού αίματος		
Παράμετρος	Ανάκτηση	Καθαρότητα
Μέσος όρος	94,3	87,6
Ελάχ./Μέγ.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

AXN ολικού αίματος		
Παράμετρος	Ανάκτηση	Καθαρότητα
Μέσος όρος	94,2	94,6
Ελάχ./Μέγ.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

EDTA μυελού των οστών		
Παράμετρος	Ανάκτηση	Καθαρότητα
Μέσος όρος	80,7	71,8
Ελάχ./Μέγ.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η κυτταρομετρία ροής ενδέχεται να παράγει ψευδή αποτελέσματα αν το κυτταρόμετρο δεν είναι σωστά ευθυγραμμισμένο, αν οι διαρροές φθορισμού δεν έχουν αντισταθμιστεί σωστά και αν οι περιοχές δεν έχουν τοποθετηθεί προσεκτικά.
2. Ορισμένοι αντιγονικοί καθοριστές μπορεί να είναι ευαίσθητοι στην φορμαλδεΐδη ή τη σαπωίνη. Κάθε εργαστήριο πρέπει να επικυρώνει τους όρους χρήσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων.
3. Ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα προκύπτουν στο μέτρο που οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι σύμφωνες με το ένθετο τεχνικών οδηγιών και συμβατές με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
4. Το αντιδραστήριο αυτό έχει βελτιστοποιηθεί για να προσφέρει την καλύτερη σχέση ειδικής σήμανσης / μη ειδικής σήμανσης. Εξαιτίας αυτού, είναι σημαντικό να τηρείται η αναλογία όγκος αντιδραστηρίου / αριθμού λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων για κάθε δοκιμασία.
5. Σε περίπτωση υπερκυττάρωσης, αραιώστε το δείγμα με PBS ώστε να επιτύχετε λιγότερα από 5×10^9 λευκοκύτταρα/L και λιγότερα από 6×10^{12} ερυθρά κύτταρα/L (6).
6. Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως η σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια ή οι αιμοσφαιρινοπάθειες, η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ενδέχεται να είναι αργή, ατελής ή και ανέφικτη. Σε αυτήν την περίπτωση, συνιστάται η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων με διαβάθμιση πυκνότητας (για παράδειγμα Ficoll) πριν από τη χρώση (7).

Δείτε το Παράρτημα για παραδείγματα και παραπομπές.

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.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Για ασθενή/χρήστη/ τρίτους στην Ευρωπαϊκή Ένωση και σε χώρες με όμοιο ρυθμιστικό καθεστώς (Οδηγία 2017/746/ΕΕ σχετικά με τα in vitro διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα), εάν, κατά τη χρήση αυτής της συσκευής ή ως αποτέλεσμα της χρήσης της, προκύψει σοβαρό περιστατικό, πρέπει να το αναφέρετε στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στις εθνικές αρχές της χώρας στην οποία κατοικείτε.

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΕΩΝ

ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ AF:	Ημερομηνία έκδοσης: Ιανουάριος 2021
ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ AW:	
Ενημερώσεις για την επίτευξη συμμόρφωσης με την παγκόσμια πολιτική σήμανσης της Beckman Coulter και σύμφωνα με τις απαιτήσεις IVD-R (EE)2017/746:	
Προσθήκη ενότητων	«Προβλεπόμενος χρήστης», «Ακρίβεια», «Λεμφοκυτταρική ανάκτηση και καθαρότητα», «Πρόσθετες πληροφορίες», «Ιστορικό αναθεωρήσεων»
Προσθήκη πληροφοριών	Δείτε τις ενότητες «Προειδοποίηση και προφυλάξεις», «Φύλαξη και σταθερότητα», «Περιορισμοί»
Ενημερωμένες ενότητες	«Προειδοποίηση και προφυλάξεις», «Ταξινόμηση επικινδυνότητας κατά ΠΕΣ», «Φύλαξη και σταθερότητα», «Ενδείξεις αλλοίωσης», «Διαδικασία», «Απόδοση»
Αφαίρεση ενότητων	Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα

Υπόμνημα συμβόλων

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

	試薬 1	試薬 2
	固定薬	透過性薬
製剤	液状	液状
有効成分	ホルムアルデヒド	サポニン
巻 (本)	5 mL	5 mL
バイアル数	3バイアル	3バイアル
1 テスト毎の容量	100 μ L	100 μ L

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 テスト150回分 ; 6 x 5 mL
2 x 0.1 mL/テスト

体外診断用医薬品

用途

IntraPrepは、モノクローナル蛍光抗体の手段により細胞内抗原決定基を立証するために、白血球の細胞質膜に透過性を誘発する2種の調製済み試薬から構成します。IntraPrepは、フローサイトメトリーで分析する生物学的検体の調製に使用します。この試薬は、この種の分析における非特異的染色を最小化するように最適化されています (1、2、3、4)。

原理

第1段階として、試薬1で細胞を固定します。洗浄後、試薬2で透過性を誘発し、残りの赤血球を溶解します。この段階中、細胞を細胞内抗原決定基に特異的な標識モノクローナル抗体と接触させます。その後フローサイトメトリーにより白血球を測定します。

それにもかかわらず、表面抗原決定基の測定が可能です。この場合、固定前に特異的な標識モノクローナル抗体をインキュベートします。

フローサイトメーターは、細胞の光拡散および蛍光を測定します。直角散乱光 (側方散乱、SS) および鋭角散乱光 (前方散乱、FS) と相関するヒストグラム上で規定した電子枠内で関心ポピュレーションの位置確認を可能にします。ユーザーが選択したアプリケーションに依存して、血球計算器で利用可能な種々の測定項目の2つを組み合わせたその他のヒストグラムが、ゲーティング段階の支援に利用可能です。

陽性染色イベントと未染色イベントを鑑別するために、区分した細胞の蛍光を測定します。結果は、ゲーティングで得られた全イベントに対する陽性イベントの比率として表します。

対象ユーザー

本製品は、検査室での専門的な使用を目的としています。

検体

静脈血や骨髄検体は、抗凝固剤としてEDTA塩、ACDまたはヘパリンを含有する無菌チューブを用いて採取しなければなりません。

サンプルは室温 (18 ~ 25°C) で保管し、振らないでください。テスト用サンプルを取る前に、サンプルをゆっくりと攪拌して均質化してください。

この検体は、静脈穿刺から24時間以内に分析する必要があります。

警告および注意

- 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 凍結しないでください。
- 露光をできるだけ避けてください。
- 試薬の微生物汚染を避けてください。誤った結果の原因となる場合があります。
- 試薬1はホルムアルデヒドを含有しています。ホルムアルデヒドには、毒性およびアレルギー誘発性があります。発がん物質とも考えられています。
- 試薬2は窒化ナトリウム (NaN₃) を含有しています。注意して取り扱わなければなりません。体内に摂取してはならず、皮膚、粘膜および眼との接触はすべて避けてください。また、アジ化ナトリウムを酸性媒体に入れた場合、危険な水素酸を形成する場合があります。アジ化ナトリウムを含む試薬を廃棄する必要がある場合、金属製のパイプにアジ化ナトリウムが蓄積しないよう、また爆発の危険性を防ぐよう、試薬を多量の水で希釈してから排水システムに廃棄することをお勧めします。
- すべての血液検体は感染性の可能性があるため慎重に取り扱う必要があります (特に保護手袋、実験着、ゴーグルの着用)。
- 絶対に口でピペットを吸わないでください。また、皮膚、粘膜、目に検体が接触しないようにしてください。

9. 使用済みの採血管およびディスプレイ製品は、焼却用の専用容器に入れて廃棄してください。

10. 試薬や廃棄物は地方自治体の要件に従って廃棄してください。

GHSハザード分類

試薬 1：固定

危険



H302	飲み込むと有害。
H313	皮膚に接触すると有害のおそれ。
H314	重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷。
H317	アレルギー性皮膚反応を起こすおそれ。
H341	遺伝性疾患のおそれの疑い。
H350	発がん性の恐れあり。
H370	臓器の障害。
P201	使用前に取扱説明書を入手すること。
P280	保護手袋/保護衣/保護眼鏡/顔面保護具を着用すること。
P303+P361+P353	皮膚(または髪)に付着した場合:皮膚を水で洗うこと。
P305+P351+P338	目に入った場合: 水で数分間注意深く洗ってください。コンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外してください。その後も洗浄を続けてください。
P310	「中毒センター」または医師にただちに連絡してください。 メタノール 1 - 2% ホルムアルデヒド 5 - 10%



安全性データシートは、beckman.com/techdocsで入手できます

保管および安定性

IntraPrepは18～25°Cで保管します。

未開封のバイアル：試薬は517日間安定しています。

開封後のバイアル：試薬は90日間安定しています。

www.beckman.comでロット固有の分析証明書を参照してください。

変質や劣化の兆候

試薬の物理的な外観の変化は劣化の徴候である場合があります、その試薬を使用してはなりません。

追加情報に関して、または損傷している製品をお受け取りになった場合、ベックマン・コールターのカスタマーサービス800-742-2345 (米国またはカナダ)にお電話をくださるか、最寄りの代理店に連絡してください。

内容

保存剤のアジ化ナトリウムは、金属製排水管内で爆発性化合物を生成するおそれがあります。NIOSH Bulletinを参照してください: アジド爆発危険性 (76/8/16)

アジド化合物が蓄積する可能性を回避するため、未希釈の試薬を廃棄した後は排水管を水で洗い流します。アジ化ナトリウムは地方自治体の規定に従い適切に廃棄してください。

ご用意いただくもの:

- ・ サンプリングに必要なサンプリングチューブと材料。
- ・ 使い捨てチップ付き自動ピペット (10, 20, 50, 100 および 500 µL 用)。
- ・ プラスチックの溶血チューブ。
- ・ 特異的モノクローナル抗体 (mAb)

- 陰性対照。
- 白血球固定試薬。例：IOTest 3固定液（製品番号A07800）。
- 緩衝化剤（PBS：0.01 Mリン酸ナトリウム、0.145 M塩化ナトリウム、pH 7.2）。
- 遠心機
- 自動アジテーター（ボルテックスタイプ）。
- フローサイトメーター

手順

A 細胞質内染色

検体中に存在する赤血球数を、 $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) 未満にします。必要な場合、PBSで希釈します。

検体中に存在する白血球数を、 $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) 未満にします。必要な場合、PBSで希釈します。

分析する各検体について、テストチューブのほか、選択した特異的染色に対応する陰性対照の存在下で細胞を混合した対照チューブ1本を追加することができます。

1. 各チューブに50 μL のテスト検体を添加します。
2. 各チューブに試薬1を100 μL 添加します。各添加後、直ちにしっかりとボルテックスします。
3. 室温（18～25°C）で15分間インキュベートします。
4. 各チューブにPBSを4 mL加えます。
5. 室温で5分間遠心分離（300 x g）します。
6. 吸引により上清を除去します。
7. 各チューブに試薬2を100 μL 添加します。ボルテックスしないこと。試薬2を細胞ペレット内に自然拡散させてください。
8. 振らずに、室温（18～25°C）で5分間インキュベートします。
9. 2～3秒間、手でゆっくりと振盪します。
10. 必要量のmAb（細胞質内抗原決定基に特異的なもの）を各テストチューブに添加し、必要に応じて適切な量の陰性対照を各対照チューブに添加します。
11. チューブごとに穏やかに攪拌します。
12. 遮光した状態で室温（18～25°C）で15分間インキュベートします。
13. 各チューブにPBSを4 mL加えます。
14. 室温で5分間遠心分離（300 x g）します。
15. 吸引により上清を除去し、細胞ペレットを希釈標準濃度（1倍）のIOTest 3固定液（REF A07800）0.5または1 mL中に再懸濁します。このように固定すると、調製物は2～8°Cの遮光下で24時間保存可能です。

B 細胞質内および膜染色

検体中に存在する赤血球数を、 $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) 未満にします。必要な場合、PBSで希釈します。

検体中の白血球数を、 $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) 未満にします。必要な場合、PBSで希釈します。

分析する各検体について、テストチューブのほか、選択した特異的染色に対応する陰性対照の存在下で細胞を混合した対照チューブ1本を追加することができます。

1. 各チューブに50 μL のテスト検体を添加します。
2. 必要量のmAb（膜抗原決定基に特異的なもの）を各テストチューブに添加し、必要に応じて、適切な量の陰性対照を各対照チューブに添加します。
3. チューブごとに穏やかに攪拌します。
4. 遮光した状態で室温（18～25°C）で15分間インキュベートします。
5. 各チューブに試薬1を100 μL 添加します。各添加後、直ちにしっかりとボルテックスします。
6. 室温（18～25°C）で15分間インキュベートします。
7. 各チューブにPBSを4 mL加えます。
8. 室温で5分間遠心分離（300 x g）します。
9. 吸引により上清を除去します。
10. 各チューブに試薬2を100 μL 添加します。ボルテックスしないこと。試薬2を細胞ペレット内に自然拡散させてください。
11. 振らずに、室温（18～25°C）で5分間インキュベートします。

12. 2~3秒間、手でゆっくりと振盪します。
13. 必要量のmAb (細胞質内抗原決定基に特異的なもの) を各テストチューブに添加し、必要に応じて適切な量の陰性対照を各対照チューブに添加します。
14. 各対照チューブに、アイソタイプの対照20 µL添加します。
15. チューブごとに穏やかに攪拌します。
16. 遮光した状態で室温 (18~25°C) で15分間インキュベートします。
17. 各チューブにPBSを4 mL加えます。
18. 室温で5分間遠心分離 (300 x g) します。
19. 吸引により上清を除去し、細胞ペレットを希釈標準濃度 (1倍) のIOTest 3固定液 (REF A07800) 0.5または1 mL中に再懸濁します。このように固定すると、調製物は2~8°Cの遮光下で24時間保存可能です。

性能

性能データは、以前に抗凝固剤としてEDTA塩を含有する無菌チューブに採取した24時間未満経過した血液検体を対象に、上述の手順を用いて取得しなければなりません。分析は、免疫染色後2時間以内に行います。

精密性

陽性値の割合は、全血および骨髄を使用して決定しました。各検体について、2台の装置で1日に2回で計4回の測定を、2ロットのIntraPrep細胞膜透過処理試薬を使用して行いました。Naviosフローサイトメーターで測定 (%陽性) しました。CLSIメソッドEP5-A2に基づいて分析しました。Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. (定量的測定メソッドの精密性性能の評価。)

当社の判定基準は、各集団について測定された陽性イベントの数によって異なります。

- 陽性イベント < 1,500 の場合、CV < 15%
- 陽性イベント > 1,500 の場合、CV < 10%

全血EDTA :

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の純度							
陽性イベント数 (平均) = 8877							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	2.29	1.82	6.47	2.25	1.65	5.82	7.09
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の回収率							
陽性イベント数 (平均) = 8877							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	0.40	1.00	0.81	0.39	0.25	0.65	1.34
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

単球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 1070							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	1.24	2.37	4.37	1.18	1.19	4.01	5.10
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

顆粒球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 13246							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	0.09	0.03	0.16	0.04	0.03	0.12	0.16
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

全血ヘパリン :

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の純度							
陽性イベント数 (平均) = 6824							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	1.33	1.17	2.74	1.65	1.66	1.73	3.40
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の回収率							
陽性イベント数 (平均) = 6824							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	2.92	2.40	3.01	0.55	0.64	0.34	3.89
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

単球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 961							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	2.02	0.96	5.17	2.32	3.74	2.94	5.74
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

顆粒球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 20742							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	1.09	1.10	2.46	1.03	1.08	1.92	2.89
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

全血ACD :

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の純度							
陽性イベント数 (平均) = 12355							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	1.91	1.60	3.54	1.55	1.35	2.65	4.18
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の回収率							
陽性イベント数 (平均) = 12355							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	0.33	0.35	1.06	0.31	0.33	0.95	1.16
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

単球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 1483							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	1.52	1.27	4.80	1.18	1.51	4.30	5.11
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

顆粒球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 32715							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	0.97	0.85	2.83	0.88	0.79	2.54	3.08
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

骨髓EDTA :

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の純度							
陽性イベント数 (平均) = 8808							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	1.16	0.89	2.98	0.72	2.32	1.46	3.19
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14膜染色 = リンパ球の回収率							
陽性イベント数 (平均) = 8808							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	0.37	0.61	1.34	0.31	0.90	0.92	1.50
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

単球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 2212							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	1.97	1.00	4.11	1.00	1.06	3.44	4.34
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

顆粒球での抗ミエロペルオキシダーゼFITC細胞質内染色							
陽性イベント数 (平均) = 33181							
	オペレータ間	血球計算器間	ロット内	ロット間	測定間	測定内	総計
CV (%)	0.11	0.29	0.37	0.10	0.13	0.33	0.48
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

リンパ球の純度と回収率

リンパ球の純度と回収率は、CDCの勧告(5)に従って評価しています。EDTA、ヘパリンおよびACD中に採取した10人の健常ドナーの血液および5つの骨髓を、モノクローナル抗体CD45-FITCとCD14-PEの混合物で標識しました。次の表に、回収率と純度の平均値および範囲を示します。

全血EDTA		
パラメータ	回収率	純度
平均	93.6	89.7
最小/最大	86.1 / 97.6	83.5 / 95.5

全血ヘパリン		
パラメータ	回収率	純度
平均	94.3	87.6
最小/最大	84.9 / 97.7	81.5 / 94.3

全血ACD		
パラメータ	回収率	純度
平均	94.2	94.6
最小/最大	91.1 / 98.5	87.6 / 97.7

骨髓EDTA		
パラメータ	回収率	純度
平均	80.7	71.8
最小/最大	78.3 / 85.8	60.1 / 83.4

制限事項

1. フローサイトメトリーは、血球計数器が完全に配列されていない場合、蛍光リークが正しく相殺されていない場合、および領域が慎重に配置されていない場合、誤った結果を示す可能性があります。
2. 一定の抗原決定基がホルムアルデヒドまたはサポニンに対して感受性を示す可能性があります。各施設は、モノクローナル抗体の使用条件を確認しなければなりません。
3. 取扱説明書および対応する検査室の実施基準に従って作業する限り、正確かつ再現性のある結果が得られます。
4. この試薬は、最良の特異的シグナル/非特異的シグナル比を示すよう最適化されています。そのため、各検査において試薬容量/白血球および赤血球数の比を順守することが重要です。
5. 細胞過多の場合、白血球数が 5×10^9 個/L未満、赤血球数が 6×10^{12} 個/L未満となるよう、検体をPBSで希釈してください(6)。
6. 重度の腎不全やヘモグロビン異常など、特定の疾患状態では、赤血球の溶解が遅くなったり、不完全になったり、あるいは溶解できないことさえあります。この場合、染色する前に密度勾配 (Ficollなど) を使用して単核細胞を分離することを推奨します(7)。

附録にある例および参考文献を参照してください。

商標

ここに記載されているBeckman Coulter、ロゴマーク、ならびにベックマン・コールターの商品およびサービスマークは、ベックマン・コールターの米国およびその他の国における商標と登録商標です。

その他

欧州連合、および規制制度が欧州連合と同一の国の患者/ユーザー/第三者 (体外診断医療機器規制2017/746/EU) については、本機器の使用または使用の結果、重大な事故が発生した場合、製造元および/または認定代理店ならびに所管の行政機関に報告してください。

改訂履歴

改訂番号 AF :	発売日 : 2021年1月
改訂番号 AW :	
ベックマン・コールターのグローバルラベリングポリシーおよびIVD-R (EU) 2017/746の要件に準拠するための更新:	
セクションの追加	対象ユーザー、精密性、リンパ球の回収率と純度、その他、改訂履歴
情報を追加	「警告および注意」、「保管および安定性」、「制限」の各セクションを参照してください。
セクションの更新	警告および注意、GHS/ハザード分類、保管および安定性、劣化の兆候、手順、性能
セクションの削除	施設内再現性

記号凡例

記号一覧は、beckman.com/techdocsで入手できます (文書番号B60062)

	试剂1	试剂2
	固定剂	透化剂
剂型	液体	液体
活性物质	甲醛	皂苷
容量	5 mL	5 mL
瓶数	3 小瓶	3 小瓶
每次检测的容量	100 μ L	100 μ L

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 Missing translation for
glossary ID 137326 (150 tests; 6 x 5
mL
2 x 0.1 mL / test)

供体外诊断使用

预期用途

IntraPrep 包括两种即用型试剂，其可诱导白细胞的细胞质膜中的渗透性，以便通过荧光单克隆抗体验证细胞内抗原决定簇。IntraPrep 用于制备生物样本，从而用流式细胞术进行分析。IntraPrep 已经过优化，以最大限度地减少此类分析中的非特异性染色 (1,2,3,4)。

原理

第一步是使用试剂 1 固定细胞。洗涤后，使用试剂 2 诱导渗透性，然后裂解剩下的红细胞。在此阶段，细胞会接触细胞内抗原决定簇特异的结合单克隆抗体。然后通过流式细胞术分析白细胞。

然而仍然可能验证表面抗原决定簇。在这种情况下，应在固定之前培育特异性结合单克隆抗体。

流式细胞分析仪可测定细胞的光漫射和荧光。这样可以定位直方图上定义的电子窗口内的感兴趣群体，直方图可以关联光的正交漫射（侧向角散射，即 SS）和窄角光的漫射（前向角散射，即 FS。）细胞分析仪上可用的结合两个不同参数的其他直方图可以用于支持设门阶段，具体取决于用户所选的应用。

为了区分阳性染色事件和未染色事件，我们对划定细胞的荧光进行了分析。结果显示为阳性事件相对于设门获得的所有事件的百分比。

预期用户

本产品的预期用户为实验室专业人员。

样本

必须使用无菌试管采集静脉血液或骨髓样本，试管内应含有 EDTA 盐、ACD 或肝素作为抗凝血剂。

样本应保存在室温(18 – 25°C)环境中，且不得摇晃。在提取检测样本之前，请将其均匀搅拌。

样本必须在静脉采血后的 24 小时内分析。

警告和注意事项

1. 请勿使用已过失效日期的试剂。
2. 切勿冷冻。
3. 尽量减少曝光。
4. 避免试剂受到微生物污染，否则可能出现错误结果。
5. 试剂 1 含有甲醛。甲醛具有毒性和致敏性，是一种致癌物质。
6. 试剂 2 含有叠氮化钠 (NaN_3)。必须小心处理。请勿内服，并避免接触皮肤、粘膜和眼睛。此外，在中度酸性条件下，叠氮化钠可形成具有潜在危害的叠氮酸。若需要对其进行处置，建议您在将试剂倒入排污系统前用大量清水将其稀释，以避免叠氮化钠在金属管中累积并预防爆炸。
7. 所有血样都必须被视为具有潜在传染性，并且必须小心处理（具体地讲：穿戴防护手套、防护服和护目镜）。
8. 不得通过嘴巴移液，并避免样本以任何方式接触皮肤、黏膜和眼睛。
9. 用于处理的血液试管和一次性材料应丢弃于专门用于焚化的容器中。
10. 应根据当地要求处置试剂和废物。

GHS 危险等级分类

试剂1：固定

危险



H302	如误服有害。
H313	皮肤接触可能有害
H314	造成严重皮肤灼伤和眼损伤。
H317	可能导致皮肤过敏反应。
H341	怀疑会导致遗传性缺陷。
H350	有致癌性。
H370	对器官造成损害。
P201	使用前取得专用说明。
P280	戴防护手套、穿防护服、戴防护眼罩/面具。
P303+P361+P353	如皮肤（或头发）沾染：用水冲洗皮肤。
P305+P351+P338	如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。如戴隐形眼镜并可方便地取出，取出隐形眼镜。继续冲洗。
P310	立即呼叫中毒控制中心或医生。
	甲醇 1 - 2%
	甲醛 5 - 10%

化学品安全技术说明书提供于 beckman.com/techdocs

存储和稳定性

IntraPrep 储存在 18–25°C 下。

未开瓶试剂的稳定性：试剂可持续 517 天保持稳定。

已开瓶试剂的稳定性：试剂可稳定保存 90 天。

请参阅 www.beckman.com 上的特定批次分析证书。

变质的迹象

试剂物理外观的任何变化都可能表明试剂变质，此时不应使用试剂。

有关其他信息，或者如果收到受损产品，请致电贝克曼库尔特公司客服：800-742-2345（美国或加拿大），或联系您当地的贝克曼库尔特代表。

目录

叠氮化钠防腐剂可在金属下水管道中形成易爆化合物。请参阅 NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76)（美国国家职业安全与卫生研究所公报：易爆的叠氮化物危险品 [76/8/16]）。

为避免可能产生的叠氮化合物堆积，请在丢弃未经稀释的试剂后用水冲洗排污管。对叠氮化钠的丢弃必须符合当地的相关规定。

试剂盒中未提供的必需材料：

- 采样所需的采样管和材料。
- 可吸取 10、20、50、100 和 500 μL 的带有一次性吸头的自动移液器。
- 塑料溶血管。
- 特异性单克隆抗体 (mAb)。
- 阴性质控品。
- 白细胞固定剂。例如：IOtest 3 固定剂 (REF A07800)。
- 缓冲液 (PBS：0.01 M 磷酸钠；0.145 M 氯化钠；pH 7.2)。
- 离心处理。
- 自动搅动器 (旋涡型)。

- 流式细胞仪。

程序

A - 细胞质内染色

样本中的红细胞数量应少于 6×10^6 个/ μL (6×10^{12} 个/L)。必要时在 PBS 中稀释。

样本中的白细胞数量应少于 5×10^3 个/ μL (5×10^9 个/L)。必要时在 PBS 中稀释。

对于分析的每个样本，除测试试管外，还可添加一个质控试管，在其中混合细胞与对应于所选特异性染色的阴性质控品。

1. 添加 50 μL 测试样本到每个试管中。
2. 向每个试管中添加 100 μL 试剂 1。每次添加后立即大力漩涡振荡。
3. 在室温 (18–25°C) 下培育 15 分钟。
4. 在每个试管中添加 4 mL PBS。
5. 在室温下以 300 x g 离心处理 5 分钟。
6. 通过吸样去除上层清液。
7. 向每个试管中添加 100 μL 试剂 2。请勿漩涡振荡，让试剂 2 自然扩散到细胞团块中。
8. 在室温 (18–25°C) 下培育 5 分钟，请勿晃动。
9. 用手轻轻摇晃 2–3 秒。
10. 向每个试管中添加必要量的 mAb (特异于细胞质内抗原决定簇)，如有必要，向每个质控试管中加入适量的阴性质控品。
11. 逐管轻轻漩涡振荡。
12. 在室温 (18–25°C) 下避光孵育 15 分钟。
13. 在每个试管中添加 4 mL PBS。
14. 在室温下以 300 x g 离心处理 5 分钟。
15. 吸取出上层清液，并在 0.5 或 1 mL 工作浓度 (1X) 的 IOTest 3 固定液 (REF A07800) 中重悬细胞团块。经如此固定的制备品可于 2–8°C 下避光储存 24 小时。

B - 细胞质内和细胞膜染色

样本中的红细胞数量应少于 6×10^6 个/ μL (6×10^{12} 个/L)。必要时使用 PBS 稀释。

样本中的白细胞数量应少于 5×10^3 个/ μL (5×10^9 个/L)。必要时使用 PBS 稀释。

对于分析的每个样本，除测试试管外，还可添加一个质控试管，在其中混合细胞与对应于所选特异性染色的阴性质控品。

1. 添加 50 μL 测试样本到每个试管中。
2. 向每个试管中添加必要量的 mAb (特异于细胞膜抗原决定簇)，如有必要，向每个质控试管中加入适量的阴性质控品。
3. 逐管轻轻漩涡振荡。
4. 在室温 (18–25°C) 下避光孵育 15 分钟。
5. 向每个试管中添加 100 μL 试剂 1。每次添加后立即大力漩涡振荡。
6. 在室温 (18–25°C) 下培育 15 分钟。
7. 在每个试管中添加 4 mL PBS。
8. 在室温下以 300 x g 离心处理 5 分钟。
9. 通过吸样去除上层清液。
10. 向每个试管中添加 100 μL 试剂 2。请勿漩涡振荡，让试剂 2 自然扩散到细胞团块中。
11. 在室温 (18–25°C) 下培育 5 分钟，请勿晃动。
12. 用手轻轻摇晃 2–3 秒。
13. 向每个试管中添加必要量的 mAb (特异于细胞质内抗原决定簇)，如有必要，向每个质控试管中加入适量的阴性质控品。
14. 向每个质控品试管中添加 20 μL 同型质控品。
15. 逐管轻轻漩涡振荡。
16. 在室温 (18–25°C) 下避光孵育 15 分钟。
17. 在每个试管中添加 4 mL PBS。
18. 在室温下以 300 x g 离心处理 5 分钟。

19. 吸取出上层清液，并在 0.5 或 1 mL 工作浓度 (1X) 的 IOTest 3 固定液 (REF A07800) 中重悬细胞团块。经如此固定的制备品可于 2-8°C 下避光储存 24 小时。

性能

使用上文描述的程序，通过分析之前采集在无菌试管（含有 EDTA 盐作为抗凝血剂）中未达 24 小时的血液样本获得了性能数据。在免疫染色后的 2 小时内进行分析。

精度

阳性百分比值以全血和骨髓样本测定。每个样本使用 2 个批次的 IntraPrep 透化试剂，在 2 台仪器上设 4 个平行样运行，每天运行 2 次，为期 1 天。使用 Navios 流式细胞仪进行测量（阳性 %）。分析基于 CLSI 方法 EP5-A2：Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods（EP5-A2：定量测量方法精度性能的评估）。

我们的接受限取决于针对每个群体所测得的阳性颗粒数：

- 如果阳性颗粒数 < 1,500，则 CV < 15%
- 如果阳性颗粒数 > 1,500，则 CV < 10%

全血 EDTA：

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞纯度							
阳性颗粒数 (平均值) = 8877							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	2.29	1.82	6.47	2.25	1.65	5.82	7.09
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞测定值							
阳性颗粒数 (平均值) = 8877							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	0.40	1.00	0.81	0.39	0.25	0.65	1.34
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

单核细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 1070							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.24	2.37	4.37	1.18	1.19	4.01	5.10
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

粒细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 13246							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	0.09	0.03	0.16	0.04	0.03	0.12	0.16
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

全血肝素：

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞纯度							
阳性颗粒数 (平均值) = 6824							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.33	1.17	2.74	1.65	1.66	1.73	3.40
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞测定值							
阳性颗粒数 (平均值) = 6824							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	2.92	2.40	3.01	0.55	0.64	0.34	3.89
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

单核细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 961							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	2.02	0.96	5.17	2.32	3.74	2.94	5.74
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

粒细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 20742							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.09	1.10	2.46	1.03	1.08	1.92	2.89
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

全血 ACD :

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞纯度							
阳性颗粒数 (平均值) = 12355							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.91	1.60	3.54	1.55	1.35	2.65	4.18
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞测定值							
阳性颗粒数 (平均值) = 12355							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	0.33	0.35	1.06	0.31	0.33	0.95	1.16
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

单核细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 1483							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.52	1.27	4.80	1.18	1.51	4.30	5.11
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

粒细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 32715							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	0.97	0.85	2.83	0.88	0.79	2.54	3.08
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

骨髓 EDTA :

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞纯度							
阳性颗粒数 (平均值) = 8808							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.16	0.89	2.98	0.72	2.32	1.46	3.19
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 细胞膜染色 = 淋巴细胞测定值							
阳性颗粒数 (平均值) = 8808							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	0.37	0.61	1.34	0.31	0.90	0.92	1.50
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

单核细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 2212							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	1.97	1.00	4.11	1.00	1.06	3.44	4.34
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

粒细胞上的抗髓过氧化物酶-FITC 细胞质内染色							
阳性颗粒数 (平均值) = 33181							
	操作人员间	细胞仪间	批次内	批次间	运行间	运行内	总数
CV (%)	0.11	0.29	0.37	0.10	0.13	0.33	0.48
结果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

淋巴细胞纯度和测定值

淋巴细胞纯度和测定值已根据 CDC 的建议进行了评估 (5)。使用含 EDTA、肝素或 ACD 的样本管采集 10 份健康供体的血样和 5 份骨髓样本，并使用单克隆抗体 CD45-FITC 和 CD14-PE 的混合物进行标记。测定值和纯度的平均值及范围见下表：

全血 EDTA		
参数	测定值	纯度
平均	93.6	89.7
最低/最高	86.1 / 97.6	83.5 / 95.5

全血肝素		
参数	测定值	纯度
平均	94.3	87.6
最低/最高	84.9 / 97.7	81.5 / 94.3

全血 ACD		
参数	测定值	纯度
平均	94.2	94.6
最低/最高	91.1 / 98.5	87.6 / 97.7

骨髓 EDTA		
参数	测定值	纯度
平均	80.7	71.8
最低/最高	78.3 / 85.8	60.1 / 83.4

限制

1. 若流式细胞术未完全校准、荧光泄漏未得到正确补偿或未在该区域谨慎定位，则流式细胞术可能会产生错误结果。
2. 某些抗原决定簇可能对甲醛或皂苷敏感。每个实验室都必须验证使用单克隆抗体的条件。
3. 只要所使用的程序符合技术插页说明书并遵守实验室管理规范，就可以获得准确和可重现的结果。
4. 该试剂已经过优化，以提供最佳的特异性信号/非特异性信号比率。因此，在每次检测中都务必遵从此试剂体积/白细胞及红细胞数量比率。
5. 如果细胞过多，请在 PBS 中稀释标本，以使白细胞少于 5×10^9 个/L，且红细胞少于 6×10^{12} 个/L (6)。
6. 在严重肾衰竭、血红蛋白病等特定疾病状态中，红细胞裂解会变得缓慢、不完全，甚至无法实现。在这种情况下，建议在染色前通过密度梯度（例如聚蔗糖）隔离单核细胞 (7)。

请参阅附录中的示例和参考文献。

商标

Beckman Coulter、标志以及文中提及的贝克曼库尔特产品和服务标记均是美国贝克曼库尔特有限公司在美国和其他国家/地区的商标或注册商标。

其他信息

对于欧盟及具有相同监管制度的国家/地区的患者/用户/第三方（Regulation 2017/746/EU on In vitro Diagnostic Medical Devices [有关体外诊断医疗装置的法规 2017/746/EU]）：如果在使用本装置期间或由于使用本装置而发生严重事件，请向制造商和/或其授权代表以及当地国家主管部门报告。

修订历史

修订版本 AF：	发布日期：2021 年 1 月
修订版本 AW：	
更新文档以符合贝克曼库尔特公司全球标签政策和 IVD-R (EU)2017/746 的要求：	
新增章节	目标用户, 精度, 淋巴细胞测定值和纯度, 其他信息, 修订历史
添加了信息	参见“警告和注意事项”、“储存及稳定性”和“限制”章节
更新后章节	警告和注意事项, GHS 危险等级分类, 储存及稳定性, 变质的迹象, 程序, 性能
删除了几个章节	实验室内重复性

符号注解

符号词汇表发布于 beckman.com/techdocs (文档编号 B60062)

	Reagentas 1	Reagentas 2
	Fiksavimo medžiaga	Laidumą skatinanti medžiaga
Būsena	Skystis	Skystis
Veiklioji medžiaga	Formaldehidas	Saponinas
Tūris	5 ml	5 ml
Buteliukų skaičius	3 buteliukai	3 buteliukai
Vieno bandymo tūris	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 bandymų; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml/bandymui

In vitro diagnostiniam naudojimui

NAUDOJIMO PASKIRTIS

„IntraPrep“ sudaro du paruošti naudoti reagentai, kurie leukocitų citoplazmines membranas daro pralaidžias, kad naudojant fluorescencinius monokloninius antikūnus būtų galima stebėti ląstelių epitopus. „IntraPrep“ naudojami srovinės citometrijos analizės biologiniams mėginiams paruošti. Jie optimizuoti, kad atliekant tokio tipo analizę iki minimumo sumažėtų nespecifinis nusidažymas (1,2,3,4).

PRINCIPAS

Iš pradžių ląstelės fiksuojamos naudojant 1 reagentą. Nuplovus ląstelės 2 reagentu padaromos pralaidžios, o likę eritrocitai lizuojami. Šiame etape sukuriama ląstelių kontaktas su ląstelių epitopams specifiniais konjuguotaisiais monokloniniais antikūnais. Tada leukocitai analizuojami taikant srovinę citometriją.

Vis dėlto įmanoma stebėti ir paviršinius epitopus. Tokiu atveju specifiniai konjuguotieji monokloniniai antikūnai prieš fiksuojant inkubuojami.

Sroviniu citometru matuojama ląstelių šviesos difuzija ir fluorescencija. Taip elektroniniame lange, apibrėžiamame difuzijos statmenąja kryptimi (šoninė sklaida, arba SS – angl. Side Scatter) ir siauro kampo difuzijos (priekinės sklaidos, arba FS – angl. Forward Scatter) koreliacijos histograma, galima lokalizuoti dominančią populiaciją. Kitas dviejų (iš įvairių galimų) citometro parametrų histogramas galima naudoti kaip pagalbą strobavimo etape, atsižvelgiant į naudotojo pasirinktą naudojimo būdą.

Analizuojant apribotų ląstelių fluorescenciją, teigiamai nudažyti įvykiai atskiriami nuo neigiamai nudažytų. Rezultatai išreiškiami kaip teigiamų įvykių procentinė dalis visų įvykių, gautų nustačius atrankos intervalą, atžvilgiu.

NUMATOMAS NAUDOTOJAS

Šis gaminy skirtas naudoti specialistams laboratorijose.

MĖGINIAI

Veninio kraujo arba kaulų čiulpų mėginius reikia imti į sterilius mėgintuvėlius su EDTA druska arba ACD, arba heparinu, kaip antikoagulantais.

Mėginius reikia laikyti kambario temperatūroje (18–25 °C) ir nepurtyti. Prieš imdami bandymui mėginį, jį homogenizuokite lengvai judindami.

Mėginiai turi būti išanalizuoti per 24 valandas po venų punkcijos.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Reagento nenaudoti pasibaigus galiojimo laikui.
2. Neužšaldyti.
3. Laikykite kuo mažiau apšviestoje vietoje.
4. Saugokite, kad reagentai nebūtų užteršti mikrobais, nes antraip gali būti gaunami klaidingi rezultatai.
5. 1 reagente yra formaldehido. Formaldehidas toksiškas ir sukelia alergiją. Manoma, kad tai kancerogeninė medžiaga.
6. 2 reagente yra natrio azido (NaN₃). Su juo būtina dirbti atsargiai. Negerkite šios medžiagos ir venkite kontakto su oda, gleivine ir akimis. Be to, rūgščioje terpėje dėl natrio azido gali susidaryti potencialiai pavojinga hidrazoinė rūgštis. Jeigu reagentą reikia išpilti, prieš pilant į kanalizacijos sistemą rekomenduojama atskiesti dideliu kiekiu vandens, kad natrio azidas nesikaupytų metaliniuose vamzdžiuose ir nekiltų sprogimo pavojus.
7. Visi kraujo mėginiai turi būti laikomi potencialiai užkrečiamais ir su jais turi būti elgiamasi atsargiai (itin svarbu dėvėti apsaugines pirštines, apsiaustus ir akinius).
8. Jokiu būdu nesiurbkite burna ir saugokitės, kad mėginių nepatektų ant odos, gleivinės ir į akis.
9. Panaudoti kraujo mėgintuvėliai ir vienkartinės medžiagos turėtų būti išmetami į sudeginamas ad hoc talpyklas.

10. Reagentai ir atliekos turi būti šalinami pagal vietinius reikalavimus.

GHS PAVOJINGUMO KLASIFIKACIJA

Reagentas 1: Fiksavimas PAVOJINGA



H302	Kenksminga prarijus.
H313	Gali būti kenksminga (-s) esant sąlyčiui su oda.
H314	Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis.
H317	Gali sukelti alerginę odos reakciją.
H341	Įtariama, kad gali sukelti genetinius defektus.
H350	Gali sukelti vėžį.
H370	Kenkia organams.
P201	Prieš naudojimą gauti specialias instrukcijas.
P280	Mūvėti apsaugines pirštines, vilkėti apsauginę aprangą ir naudoti akių (veido) apsaugos priemones.
P303+P361+P353	PATEKUS ANT ODOS (arba plaukų): odą nuplauti vandeniu.
P305+P351+P338	PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu galima lengvai tai padaryti. Toliau plauti akis.
P310	Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Metanolis 1 - 2 % Formaldehidas 5 - 10 %



Saugos duomenų lapą galima gauti interneto svetainėje techdocs.beckman.com

LAIKYMAS IR STABILUMAS

„IntraPrep“ laikomi 18–25 °C temperatūroje.

Uždaryto buteliuko stabilumas: reagentas lieka stabilus 517 d.

Atidaryto buteliuko stabilumas: reagentas lieka stabilus 90 d.

Žr. konkrečios partijos analizės sertifikata, pateikiamą interneto svetainėje www.beckman.com.

KOKYBĖS PABLOGĖJIMO POŽYMAI

Bet koks reagentų fizinės išvaizdos pokytis gali reikšti pablogėjusias gaminio savybes, todėl tokio reagento naudoti negalima.

Prireikus papildomos informacijos arba gavę sugadintą gaminį skambinkite į „Beckman Coulter“ klientų aptarnavimo skyrių telefonu 800-742-2345 (JAV arba Kanadoje) arba susisiekite su vietiniu „Beckman Coulter“ atstovu.

TURINYS

Natrio azido konservantas metalo vamzdynuose gali sudaryti sproguosius junginius. Žr. „NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard“ (Nacionalinio darbų saugos ir sveikatos instituto biuletenį: sprogstamojo azido pavojus) (76-8-16).

Norėdami išvengti galimo azido junginių susikaupimo, išpylę į kanalizacijos sistemą neatskiesto reagento, vandeniu praplaukite nutekamuosius vamzdžius. Natrio azidas turi būti šalinamas pagal taikomų vietos reglamentų reikalavimus.

REIKALINGOS, BET SU RINKINIU NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS

- Mėginiams imti reikalingi mėginių ėmimo mėgintuvėliai ir medžiagos.
- Automatinės pipetės su vienkartiniais 10, 20, 50, 100 ir 500 µl antgaliais
- Plastikiniai hemolizės mėgintuvėliai.
- Specifiniai monokloniniai antikūnai (mAb)

- Neigiamosios kontrolinės medžiagos.
- Leukocitų fiksavimo reagentas. Pavyzdys: fiksavimo tirpalas „IOTest 3“ (kat. Nr. A07800).
- Buferinis tirpalas (fosfato buferinis tirpalas: 0,01 M natrio fosfato; 0,145 M natrio chlorido; pH 7,2).
- Nucentrifuguokite.
- Automatinis maišytuvas (sūkurinio tipo).
- Srauto citometras.

PROCEDŪRA

Intracitoplazminis dažymas

Mėginyje turi būti mažiau nei $6 \times 10^6/\mu\text{l}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) raudonųjų kraujo kūnelių. Jeigu reikia, atskieskite PBS.

Mėginyje turi būti mažiau nei $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) leukocitų. Jeigu reikia, atskieskite PBS.

Kiekvienam analizuojamam mėginiui be tiriamojo mėgintuvėlio galima naudoti vieną kontrolinį mėgintuvėlį, kuriame ląstelės sumaišomos su pasirinktą specifinį nusidažymą atitinkančia neigiamąja kontroline medžiaga.

1. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 50 μl tiriamojo mėginio.
2. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 100 μl 1 reagento. Intensyviai maišykite iš karto, kai tik pridedamas kiekvienas mėginys.
3. Inkubuokite 15 minučių kambario temperatūroje (18–25 °C).
4. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 4 ml fosfato buferinio tirpalo.
5. Centrifuguokite 5 minutės kambario temperatūroje 300 x g jėga.
6. Išsiurbdami pašalinkite supernatantą.
7. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 100 μl 2 reagento. NEMAIŠYKITE, palikite 2 reagentą natūraliai įsiskverbti į ląstelių granules.
8. Inkubuokite 5 minutės kambario temperatūroje (18–25 °C) NEPURTYDAMI.
9. Atsargiai papurtykite rankomis 2–3 sekundes.
10. Į kiekvieną tiriamąjį mėgintuvėlį įpilkite reikiamą kiekį monokloninių antikūnų (specifinių intracitoplazminiam antigeniniam determinantui) ir, jei reikia, į kiekvieną kontrolinį mėgintuvėlį įpilkite reikiamą kiekį neigiamosios kontrolinės medžiagos.
11. Lengvai pamaišykite mėgintuvėlio turinį sūkuriniu metodu.
12. 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (18–25 °C), saugodami nuo šviesos.
13. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 4 ml fosfato buferinio tirpalo.
14. Centrifuguokite 5 minutės kambario temperatūroje 300 x g jėga.
15. Siurbdami pašalinkite supernatantą ir iš naujo pamerkite ląstelių granules į 0,5 arba 1 ml IOTest 3 darbinės koncentracijos (1X) fiksavimo tirpalo (REF A07800). Taip fiksuotus preparatus 2–8 °C temperatūroje saugant nuo šviesos galima laikyti 24 valandas.

Intracitoplazminis ir membraninis dažymas

Mėginyje turi būti mažiau nei $6 \times 10^6/\mu\text{l}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) raudonųjų kraujo kūnelių. Jeigu reikia, atskieskite PBS.

Mėginyje turi būti mažiau nei $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) leukocitų. Jeigu reikia, atskieskite PBS.

Kiekvienam analizuojamam mėginiui be tiriamojo mėgintuvėlio galima naudoti vieną kontrolinį mėgintuvėlį, kuriame ląstelės sumaišomos su pasirinktą specifinį nusidažymą atitinkančia neigiamąja kontroline medžiaga.

1. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 50 μl tiriamojo mėginio.
2. Į kiekvieną tiriamąjį mėgintuvėlį įpilkite reikiamą kiekį monokloninių antikūnų (specifinių membraniniam antigeniniam determinantui) ir, jei reikia, į kiekvieną kontrolinį mėgintuvėlį įpilkite reikiamą kiekį neigiamosios kontrolinės medžiagos.
3. Lengvai pamaišykite mėgintuvėlio turinį sūkuriniu metodu.
4. 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (18–25 °C), saugodami nuo šviesos.
5. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 100 μl 1 reagento. Intensyviai maišykite iš karto, kai tik pridedamas kiekvienas mėginys.
6. Inkubuokite 15 minučių kambario temperatūroje (18–25 °C).
7. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 4 ml fosfato buferinio tirpalo.
8. Centrifuguokite 5 minutės kambario temperatūroje 300 x g jėga.
9. Išsiurbdami pašalinkite supernatantą.
10. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 100 μl 2 reagento. NEMAIŠYKITE, palikite 2 reagentą natūraliai įsiskverbti į ląstelių granules.

11. Inkubuokite 5 minutės kambario temperatūroje (18–25 °C) NEPURTYDAMI.
12. Atsargiai papurtykite rankomis 2–3 sekundes.
13. Į kiekvieną tiriamąjį mėgintuvėlį įpilkite reikiamą kiekį monokloninių antikūnų (specifinių intracitoplazminiam antigeniniam determinantui) ir, jei reikia, į kiekvieną kontrolinį mėgintuvėlį įpilkite reikiamą kiekį neigiamosios kontrolinės medžiagos.
14. Į kiekvieną kontrolinį mėgintuvėlį įpilkite 20 µl izotipinės kontrolinės medžiagos.
15. Lengvai pamaišykite mėgintuvėlio turinį sukuriniu metodu.
16. 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (18–25 °C), saugodami nuo šviesos.
17. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilkite po 4 ml fosfato buferinio tirpalo.
18. Centrifuguokite 5 minutės kambario temperatūroje 300 x g jėga.
19. Siurbdami pašalinkite supernatantą ir iš naujo pamerkite ląstelių granules į 0,5 arba 1 ml IOTest 3 darbinės koncentracijos (1X) fiksavimo tirpalo (REF A07800). Taip fiksuotus preparatus tamsioje vietoje 2–8 °C temperatūroje galima laikyti 24 valandas.

VEIKIMAS

Veikimo duomenys gauti, pirmiau aprašytą procedūrą atliekant su mažiau nei 24 val. senumo mėginiais, kurie buvo anksčiau paimti į sterilius mėgintuvėlius su antikoaguliantu EDTA druska. Analizė atliekama ne vėliau kaip 2 val. po imunodažymo.

GLAUDUMAS

Procentinės teigiamosios vertės nustatytos naudojant visą kraują ir kaulų čiulpus. Kiekvienas mėginys buvo analizuojamas 4 kartus: 1 dieną po du kartus, naudojant 2 prietaisus ir 2 „IntraPrep“ pralaidumo reagento partijas. Matavimai (% teigiamų) buvo atlikti srauto citometru „Navios“. Analizė atlikta pagal CLSI metodą EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods“ (CLSI metodą EP5-A2 „Kiekybinių matavimo metodų glaudumo veikimo vertinimas“).

Mūsų priėmimo kriterijai priklauso nuo kiekvienoje populiacijoje nustatyto teigiamų įvykių skaičiaus:

- jeigu teigiamų įvykių < 1 500, VK < 15 %
- Jeigu teigiamų įvykių > 1 500, VK < 10 %

Viso kraujo EDTA:

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų grynumas							
Teigiamų įvykių skaičius (vidurkis) = 8877							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų atkūrimas							
Teigiamų įvykių skaičius (vidurkis) = 8877							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant monocitų							
Teigiamų įvykių skaičius (vidurkis) = 1070							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant granulocitų							
Teigiamų įvykių skaičius (vidurkis) = 13246							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Viso kraujo HEPARINAS:

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų grynumas							
Teigiamų įvykių skaičius (vidurkis) = 6824							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)							
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VK (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų atkūrimas							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 6824							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant monocitų							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 961							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant granulocitų							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 20742							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Viso kraujo LLA:

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų grynumas							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 12355							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų atkūrimas							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 12355							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant monocitų							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 1483							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant granulocitų							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 32715							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Kaulų čiulpų EDTA:

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų grynumas							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 8808							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranos dažymas = limfocitų atkūrimas							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 8808							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant monocitų							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 2212							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antikūnų prieš mieloperoksidazę FITC intracitoplazminis dažymas ant granulocitų							
Teigiamų jvykių skaičius (vidurkis) = 33181							
	Skirtingų operatorių	Skirtingų citometrų	Tos pačios partijos	Skirtingų partijų	Skirtingų analizių	Tos pačios analizės	Iš viso
VK (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
REZULTATAI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LIMFOCITŲ GRYNUMAS IR ATKŪRIMAS

Limfocitų grynumas ir atkūrimas įvertinti pagal CDC rekomendacijas (5). Į EDTA, heparino ir LLA mėginius paimtas 10 sveikų donorų kraujas ir 5 kaulų čiulpai buvo pažymėti monokloninių antikūnų CD45-FITC ir CD14-PE mišiniu. Atkūrimo ir grynumo vidurkiai ir diapazonai nurodyti lentelėse.

Viso kraujo EDTA		
Parametras	Atkūrimas	Grynumas
Vidutinė rizika	93,6	89,7
Maž. / didž.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Viso kraujo HEPARINAS		
Parametras	Atkūrimas	Grynumas
Vidutinė rizika	94,3	87,6
Maž. / didž.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Viso kraujo LLA		
Parametras	Atkūrimas	Grynumas
Vidutinė rizika	94,2	94,6
Maž. / didž.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Kaulų čiulpių EDTA		
Parametras	Atkūrimas	Grynumas
Vidutinė rizika	80,7	71,8
Maž. / didž.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

RIBOJIMAI

1. Atliekant srauto citometriją klaidingi rezultatai gali būti gauti tuo atveju, jei citometras nebuvo tiksliai sureguliuotas, fluorescencijos nuotėkiai nebuvo tinkamai kompensuoti ar regionai nebuvo kruopščiai išdėstyti.
2. Kai antigeno veiksniai gali būti jautrūs formaldehido arba saponine. Kiekviena laboratorija turi patvirtinti naudojimo monokloninius antikūnus sąlygas.
3. Tikslūs ir atkuriami rezultatai bus gaunami tol, kol naudojamos procedūros atitiks techniniame lapelyje pateiktą informaciją ir bus atliekamos laikantis geros laboratorijos praktikos.
4. Šis reagentas buvo optimizuota siekiant pasiūlyti geriausias konkretų signalą / nespecifinį signalo santykis. Todėl svarbu laikytis reagento tūrio / numeris leukocitų ir eritrocitų kiekvieno bandymo koeficiento.
5. Jei hypercellularity atveju, atskieskite PBS pavyzdį, siekiant gauti mažiau nei 5×10^9 / l leukocitų ir mažiau nei 6×10^{12} raudonųjų kraujo ląstelių / l (6).
6. Sergant kai kuriomis ligomis, pavyzdžiui, sunkiu inkstų nepakankamumu arba hemoglobopatijomis, eritrocitai gali būti lėtai arba nevysiškai sulizuojami arba jų visai neįmanoma lizuoti. Tokiu atveju rekomenduojama prieš dažant atskirti vienbranduoles ląsteles tankio gradiento būdu (pavyzdžiui, Ficoll) (7).

Pavyzdžiai ir nuorodos pateikti priede.

PREKIŲ ŽENKLAI

„Beckman Coulter“, stilizuotas logotipas ir kiti šiame dokumente nurodyti „Beckman Coulter“ gaminių ir prekių ženklai yra „Beckman Coulter, Inc.“ prekių ženklai arba registruotieji prekių ženklai Jungtinėse Amerikos Valstijose ir kitose šalyse.

PAPILDOMA INFORMACIJA

Pacientams / naudotojams / trečiosioms šalims Europos Sąjungoje ir šalyse, kuriose galioja identiški reguliaciniai reikalavimai (Reglamentas (ES) 2017/746 dėl in vitro diagnostikos medicinos priemonių): jeigu naudojant šią priemonę arba dėl jos

naudojimo įvyko sunkus incidentas, apie jį praneškite gamintojui ir (arba) jo įgaliotajam atstovui ir savo šalies nacionalinei institucijai.

PERŽIŪRŲ ISTORIJA

PERŽIŪRA AF:	Leidimo data: 2021 m. sausis
PERŽIŪRA AW:	
Atnaujinta pagal „Beckman Coulter“ visuotinių ženklavimo taisyklių ir IVD-R (ES)2017/746 reikalavimus.	
Pridėti skyriai	Numatytas naudotojas, glaudumas, limfocitų atkūrimas ir grynumas, papildoma informacija, peržiūrų istorija
Pridėta informacija	Žr. skyrius „Ispėjimai ir atsargumo priemonės“, „Laikymas ir stabilumas“, „Ribojimai“
Atnaujinti skyriai	Ispėjimai ir atsargumo priemonės, visuotinai suderintos sistemos (GHS) pavojingumo klasifikacija, laikymas ir stabilumas, kokybės pablogėjimo požymiai, procedūra, veikimas
Pašalinti skyriai	Atkuriamumas vienoje laboratorijoje

Simbolių sutartiniai ženklai

Simbolių terminų žodynas pateikiamas interneto svetainėje beckman.com/techdocs (dokumento numeris B60062).

	1. reagens	2. Reagens
	Fixáló anyag	Permeabilizáló anyag
Kiszerezés	Folyadék	Folyadék
Hatóanyag	Formaldehid	Szaponin
Térfogat	5 mL	5 mL
Csővek száma	3 cső	3 cső
Térfogat tesztenként	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 teszt; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / teszt

In vitro diagnosztikai használatra.

RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT

Az IntraPrep két felhasználásra kész reagenst tartalmaz, amik fokozzák a leukociták citoplazma membránjainak permeabilitását, így a fluoreszcens monoklonális ellenanyagokkal kimutathatók az intracelluláris antigén-determinánsok. Az IntraPrep biológiai minták áramlásos citometriával történő vizsgálatához használható. Az IntraPrepet úgy optimalizálták, hogy a nem specifikus festődést a lehető legkisebbre csökkentse az ilyen típusú vizsgálatokban (1,2,3,4).

MŰKÖDÉSI ELV

Az első lépés a sejtek fixálása az 1. reagenssel. A mosást követően a 2. reagens alkalmazása fokozza a sejtek permeabilitását és lizálja a maradék vörösvértesteket. Ebben az állapotban a sejtekhez adhatók a konjugált monoklonális antitestek, amelyek az intracelluláris antigén-determinánsokhoz kötődnek. Ezután a leukociták áramlásos citometriával vizsgálhatóak.

Mindemellett a felületi antigén-determinánsok is kimutatása is lehetséges. Ebben az esetben a specifikus konjugált monoklonális antitestekkel a fixálás előtt kell inkubálni a sejteket.

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.

Az elkülönített sejtek fluoreszcenciáját a rendszer elemzi a pozitívan festődött események megkülönböztetésére a nem festődöttektől. Az eredmények kifejezése a pozitív események százalékos arányaként történik a kapuzás által regisztrált összes eseményhez képest.

CÉLFELHASZNÁLÓ

Ez a termék laboratóriumi szakemberek általi használatra készült.

MINTÁK

A vénás vérmintákat és csontvelőmintákat steril, alvadástgátlóként EDTA sóját, ACD-t vagy heparint 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 minták elemzését a vénaszűréshez képest 24 órán belül el kell végezni.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

1. Ne használja a reagenst a lejáratú időn túl.
2. Fagyasztani tilos.
3. Minimalizálja a fényexpozíciót.
4. Kerülje el a reagensek mikrobiális kontaminációját, ebben az esetben hamis eredményeket kaphat.
5. Az 1. reagens formaldehidet tartalmaz. A formaldehid mérgező és allergén. Karcinogén szernek tartják.
6. A 2-es reagens Nátrium-azid (NaN₃) tartalmaz. A nátrium nitridet körültekintően kell kezelni. 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.
7. Minden vérmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni, és óvatosan kell kezelni (azaz védőkesztyűt, köpenyt és szemüveget viselve).
8. Soha ne pipetázzon szájjal, és a minták soha ne érintkezzenek szemmel, bőrrel vagy nyálkahártyával!

9. A vércsőveket és a kezeléshez használt, egyszer használatos anyagokat olyan ad hoc tartóedényben kell kidobni, amely égetésre szolgál.

10. A reagenseket és a hulladékot a helyi követelmények szerint kell ártalmatlanítani.

GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

1. reagens: fixálás

VESZÉLY!



H302	Lenyelve ártalmas.
H313	Bőrrel érintkezve káros hatású lehet.
H314	Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz.
H317	Allergiás bőrreakciót válthat ki.
H341	Feltehetően genetikai károsodást okoz.
H350	Rákot okozhat (karcinogén hatású lehet).
H370	Károsítja a szerveket.
P201	Használat előtt ismerje meg a vizsgálatra vonatkozó különleges utasításokat.
P280	Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P303+P361+P353	HA BŐRRE (vagy hajra) KERÜL: A bőrt le kell öblíteni vízzel.
P305+P351+P338	SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
P310	Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Metanol 1 - 2% Formaldehid 5 - 10%



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

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

Az IntraPrep oldatot 18 – 25 °C hőmérsékleten kell tárolni.

A lezárt fiola stabilitása: a reagens 517 napig stabil.

A felbontott fiola stabilitása: a reagens 90 napig stabil.

Lásd: www.beckman.com, tételspecifikus analitikai bizonylat.

A MINŐSÉGROMLÁS JELEI

A reagensek fizikai megjelenésének bármilyen megváltozása megromlásra utalhat, és a reagenst nem szabad felhasználni.

További információkért, illetve sérült termék kézhezvétele esetén hívja a Beckman Coulter ügyfélszolgálatát a 800-742-2345-es számon (az Amerikai Egyesült Államokban és Kanadában), vagy lépjen kapcsolatba a Beckman Coulter területileg illetékes képviselőjével.

A CSOMAG TARTALMA

A nátrium-azid tartósítószer robbanékony vegyületeket képezhet a fém lefolyócsövekben. Lásd az alábbi NIOSH-közleményt: Explosive Azide Hazard (Robbanékony azidokkal kapcsolatos veszélyek) (76. 8. 16.).

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

SZÜKSÉGES, DE A KÉSZLETTEL NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK:

- Mintacsövek és a mintavételhez használt anyagok.

- 10, 20, 50, 100 és 500 µL-es automata pipetták és eldobható pipettahegyek.
- Műanyag hemolíziscsövek.
- Specifikus monoklonális antitestek (mAb).
- Negatív kontrollok.
- Leukocitafixáló reagens. Például: IOTest 3 fixálóoldat (Ref. A07800).
- Puffer (PBS: 0,01 M nátrium-foszfát; 0,145 M nátrium-klorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automata keverő (vortex típusú).
- Áramlási citométer.

ELJÁRÁS

A - Intracitoplazmatikus festés

A mintában a vörösvértestek számának kevesebbnek kell lenni, mint $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Ha szükséges, PBS-sel hígítsa a mintát.

A leukociták számának a mintában kevesebbnek kell lennie mint, $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Ha szükséges, PBS-sel hígítsa a mintát.

Mindegyik analizált minta esetében a vizsgált testcsövön kívül a vizsgálatot ki lehet egészíteni egy kontrollcsővel, amelyben a sejtek a kiválasztott festésnek megfelelő negatív kontroll jelenlétében vannak összekeverve.

1. Adjon 50 µL tesztmintát mindegyik csőhöz.
2. Adjon 100 µL 1. reagenst mindegyik mintacsőhöz. A hozzáadás után mindig azonnal keverje össze erőteljesen vortex keverővel.
3. Inkubálja a mintákat szobahőmérsékleten (18 – 25 °C), 15 percig.
4. Tegyén mindegyik kémcsőbe 4 mL PBS reagenst.
5. Centrifugálja a kémcsöveket 5 percig 300 x g sebességen, szobahőmérsékleten.
6. Felszívás segítségével távolítsa el a felülúszót.
7. Adjon 100 µL 2. reagenst mindegyik testcsőhöz. NE KEVERJE ÖSSZE VORTEX KEVERŐVEL, hanem hagyja, hogy a 2. reagens szabadon diffundáljon a pelletbe.
8. NE RÁZZA A MINTÁKAT. Inkubálja szobahőmérsékleten (18 – 25 °C), 5 percig.
9. Kézzel rázza fel lassan a mintákat 2 – 3 másodpercig.
10. Adja hozzá mindegyik testcsőhöz a szükséges mennyiségű (intracitoplazmatikus antigén-determinánsra specifikus) mAb-t, és ha szükséges, adjon hozzá megfelelő mennyiségű negatív kontrollt mindegyik kontrollcsőhöz.
11. Óvatosan vortexelje egyik csövet a másik után.
12. Inkubálja 15 percig szobahőmérsékleten (18–25 °C), fénytől védett helyen.
13. Tegyén mindegyik kémcsőbe 4 mL PBS reagenst.
14. Centrifugálja a kémcsöveket 5 percig 300 x g sebességen, szobahőmérsékleten.
15. Távolítsa el a felülúszót és oldja fel a sejtüledéket 0,5 vagy 1 mL 1X koncentrációjú (munkahígítás) IOTest 3 Fixáló Oldatban (Ref. A07800). A fixált minták fénytől védett helyen, 2 és 8 °C közt tárolhatók 24 órán keresztül.

B - Intracitoplazmatikus és membrán festés

A mintában a vörösvértestek számának kevesebbnek kell lenni, mint $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Ha szükséges, PBS-sel hígítsa a mintát.

A leukociták számának a mintában kevesebbnek kell lennie mint, $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Ha szükséges, PBS-sel hígítsa a mintát.

Mindegyik analizált minta esetében a vizsgált testcsövön kívül a vizsgálatot ki lehet egészíteni egy kontrollcsővel, amelyben a sejtek a kiválasztott festésnek megfelelő negatív kontroll jelenlétében vannak összekeverve.

1. Adjon 50 µL tesztmintát mindegyik csőhöz.
2. Adja hozzá mindegyik testcsőhöz a szükséges mennyiségű (membránon lévő antigén-determinánsra specifikus) mAb-t, és ha szükséges, adjon hozzá megfelelő mennyiségű negatív kontrollt mindegyik kontrollcsőhöz.
3. Óvatosan vortexelje egyik csövet a másik után.
4. Inkubálja 15 percig szobahőmérsékleten (18–25 °C), fénytől védett helyen.

5. Adjon 100 µL 1. reagenst mindegyik mintacsőhöz. A hozzáadás után mindig azonnal keverje össze erőteljesen vortex keverővel.
6. Inkubálja a mintákat szobahőmérsékleten (18 – 25 °C), 15 percig.
7. Tegyen mindegyik kémcsőbe 4 mL PBS reagenst.
8. Centrifugálja a kémcsöveket 5 percig 300 x g sebességen, szobahőmérsékleten.
9. Felszívás segítségével távolítsa el a felülúszót.
10. Adjon 100 µL 2. reagenst mindegyik testcsőhöz. **NE KEVERJE ÖSSZE VORTEX KEVERŐVEL**, hanem hagyja, hogy a 2. reagens szabadon diffundáljon a pelletbe.
11. **NE RÁZZA A MINTÁKAT.** Inkubálja szobahőmérsékleten (18 – 25 °C), 5 percig.
12. Kézzel rázza fel lassan a mintákat 2 – 3 másodpercig.
13. Adja hozzá mindegyik testcsőhöz a szükséges mennyiségű (intracitoplazmatikus antigén-determinánsra specifikus) mAb-t, és ha szükséges, adjon hozzá megfelelő mennyiségű negatív kontrollt mindegyik kontrollcsőhöz.
14. Minden kontroll csőbe adjon 20 µL izotipikus kontrollt.
15. Óvatosan vortexelje egyik csövet a másik után.
16. Inkubálja 15 percig szobahőmérsékleten (18–25 °C), fénytől védett helyen.
17. Tegyen mindegyik kémcsőbe 4 mL PBS reagenst.
18. Centrifugálja a kémcsöveket 5 percig 300 x g sebességen, szobahőmérsékleten.
19. Távolítsa el a felülúszót és oldja fel a sejtüledéket 0,5 vagy 1 mL 1X koncentrációjú (munkahígítás) IOTest 3 Fixáló Oldatban (Ref. A07800). A fixált minták fénytől védett helyen, 2 és 8 °C közt tárolhatók 24 órán keresztül.

TELJESÍTMÉNY

A teljesítményadatokat a fent leírt eljárás segítségével lehet megkapni az alvadégszűrés után EDTA-sót tartalmazó steril csövekbe levett vérmintákból a vérvételt követő kevesebb mint 24 órán belül. Az analízist az immunfestést követő 2 órán belül kell elvégezni.

PRECIZITÁS

A százalékos pozitív értékeket teljes vér és csontvelő felhasználásával határozták meg. Mindegyik mintát 4-szer futtatták, naponta kétszer 1 napig, 2 berendezésen, az IntraPrep permeabilizáló reagens 2 gyártási tételének felhasználásával. A méréseket (pozitív %) Navios áramlási citométerrel végezték. Az analízist a CLSI által közzétett EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (A kvantitatív mérési módszerek precizitási teljesítményének értékelése) módszer alapján végezték.

Az elfogadhatósági kritériumaink az egyes populációknál mért pozitív események számától függ:

- Ha a pozitív esemény < 1500, CV < 15%
- Ha a pozitív esemény > 1500, CV < 10%

Teljes vér, EDTA-s:

CD45/CD14 membránfestés = limfocita tisztaság							
Pozitív események száma (átlag) = 8877							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tételen belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membránfestés = limfocita visszanyerés							
Pozitív események száma (átlag) = 8877							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tételen belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés monocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 1070							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tételen belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés granulocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 13246							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tétel belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Teljes vér, HEPARIN:

CD45/CD14 membránfestés = limfocita tisztaság							
Pozitív események száma (átlag) = 6824							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tétel belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membránfestés = limfocita visszanyerés							
Pozitív események száma (átlag) = 6824							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tétel belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés monocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 961							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tétel belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés granulocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 20742							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tétel belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Teljes vér, ACD-s:

CD45/CD14 membránfestés = limfocita tisztaság							
Pozitív események száma (átlag) = 12355							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tétel belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membránfestés = limfocita visszanyerés							
Pozitív események száma (átlag) = 12355							
	Felhasználók közötti	Citométerek közötti	Egy gyártási tétel belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés monocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 1483							

	Felhasználók közötti	Citóméterek közötti	Egy gyártási tételben belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés granulocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 32715							
	Felhasználók közötti	Citóméterek közötti	Egy gyártási tételben belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Csontvelő, EDTA:

CD45/CD14 membránfestés = limfocita tisztaság							
Pozitív események száma (átlag) = 8808							
	Felhasználók közötti	Citóméterek közötti	Egy gyártási tételben belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membránfestés = limfocita visszanyerés							
Pozitív események száma (átlag) = 8808							
	Felhasználók közötti	Citóméterek közötti	Egy gyártási tételben belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés monocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 2212							
	Felhasználók közötti	Citóméterek közötti	Egy gyártási tételben belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoxidáz-FITC intracitoplazmatikus festés granulocitákon							
Pozitív események száma (átlag) = 33181							
	Felhasználók közötti	Citóméterek közötti	Egy gyártási tételben belüli	Eltérő gyártási tételek közötti	Futtatások közötti	Egy futtatáson belüli	Összes
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
EREDMÉNYEK	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LIMFOCITA TISZTASÁG ÉS VISSZANYERÉS

A limfociták tisztaságát és visszanyerését a CDC ajánlásai (5) szerint értékelték. 10 egészséges donortól EDTA-s, a heparinos vagy ACD-s csőbe levett vérmintát és 5 csontvelőmintát CD45-FITC és CD14-PE monoklonális antitestek keverékével jelölték. A visszanyerés és a tisztaság átlagértékeit és tartományát a következő táblázatok tartalmazzák:

Teljes vér, EDTA-s		
Paraméter	Visszanyerés	Tisztaság
Átlag	93,6	89,7
Min./max.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Teljes vér, HEPARIN		
Paraméter	Visszanyerés	Tisztaság
Átlag	94,3	87,6
Min./max.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Teljes vér, ACD-s		
Paraméter	Visszanyerés	Tisztaság
Átlag	94,2	94,6
Min./max.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Csontvelő, EDTA		
Paraméter	Visszanyerés	Tisztaság
Átlag	80,7	71,8
Min./max.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

KORLÁTOZÁSOK

1. Az áramlási citometria hamis eredményeket adhat, ha a citométert nem igazítják tökéletesen, ha nem kompenzálják megfelelően a fluoreszcenciaszivárgást és ha a régiókat nem pozicionálják elég gondosan.
2. Bizonyos antigén-determinánsok érzékenyek lehetnek a formaldehidre vagy a szaponinra. Minden laboratóriumnak validálnia kell a monoklonális ellenanyagok használatának körülményeit.
3. Pontos és megismételhető eredmények születnek, amennyiben az eljárásokat a műszaki tájékoztató szerint és a helyes laboratóriumi gyakorlattal összhangban végzik el.
4. A reagens a legjobb specifikus jel / nem specifikus jel arányra van optimalizálva. Ezért fontos, hogy minden teszt során betartsa a javasolt reagens térfoga / leukocita és vörösvértest szám arányt.
5. Hipercellularitás esetén hígítsa PBS-el a mintát olyan mértékben, hogy kevesebb mint 5×10^9 leukocita/L és kevesebb mint 6×10^{12} vörösvértest/L sejtkoncentrációt érjen el (6).
6. Bizonyos betegségek, például súlyos veseelégtelenség vagy hemoglobinopátiák esetében előfordulhat, hogy a vörösvértestek lízise lassú, részleges, vagy akár lehetetlen. Ilyenkor javasolt a festés előtt a mononukleáris sejtek elkülönítése egy sűrűséggradiens alapján működő eljárással (ilyen például a Ficoll) (7).

A példákért és az irodalomjegyzékért lásd a Függelékét.

VÉDJEGYEK

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

TOVÁBBI INFORMÁCIÓK

Az Európai Unióban, illetve az EU-val azonos szabályozási rendszerrel (lásd: az EU 2017/746 rendelete az in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökről) rendelkező országokban élő beteg/felhasználó/harmadik fél esetében: ha a jelen eszköz használata során vagy használata eredményeként súlyos váratlan esemény történik, kérjük, jelentse azt a gyártónak és/vagy hivatalos területi képviselőjének, valamint az illetékes nemzeti hatóságnak.

ÁTDOLGOZÁSOK

AF ÁTDOLGOZÁS:	Közzététel dátuma: 2021. január
AW ÁTDOLGOZÁS:	
A Beckman Coulter globális címkézési szabályzatának megfelelő, valamint az IVD-R (EU) 2017/746 követelmények szerinti frissítések:	
Hozzáadott szakaszok	Célfelhasználó, Precizitás, Limfociták visszanyerése és tisztasága, További információk, Átdolgozások
Új információk	Lásd a Figyelmeztetések és óvintézkedések, a Tárolás és stabilitás és a Korlátozások című részt.
Frissített szakaszok	Figyelmeztetések és óvintézkedések, GHS szerinti veszélyességi besorolás, Tárolás és stabilitás, A minőségromlás jelei, Eljárás, Teljesítmény
Eltávolított szakaszok	Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság

Szimbólumok listája

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

	Odczynnik 1	Odczynnik 2
	Środek utrwalający	Środek zwiększający przepuszczalność
Postać	Ciecz	Ciecz
Substancja czynna	Formaldehyd	Saponina
Objętość	5 mL	5 mL
Liczba fiolek	3 fiołki	3 fiołki
Objętość na test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testów : 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / test

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

PRZEZNACZENIE

IntraPrep składa się z dwóch, gotowych do użycia odczynników, które zwiększają przepuszczalność błony komórkowej leukocytów w celu prezentacji wewnątrzkomórkowych determinant antygenowych za pomocą monoklonalnych przeciwciał fluorescencyjnych. IntraPrep stosowany jest w przygotowaniu próbek biologicznych do analizy metodą cytometrii przepływowej. Został zoptymalizowany pod kątem minimalizacji odczynów nieswoistych w tego rodzaju analizach (1,2,3,4).

ZASADA DZIAŁANIA

W pierwszym kroku komórki utrwalane są odczynnikiem 1. Po płukaniu za pomocą odczynnika 2 indukuje się zwiększoną przepuszczalność, a pozostałe erytrocyty poddaje się lizie. Na tym etapie komórki stykają się ze sprzężonymi przeciwciałami monoklonalnymi swoistymi dla wewnątrzkomórkowych determinant antygenowych. Leukocyty poddawane są następnie analizie metodą cytometrii przepływowej.

Pomimo tego nadal możliwa jest prezentacja powierzchniowych determinant antygenowych. W takim przypadku swoiste sprzężone przeciwciała monoklonalne inkubowane są przed utrwalaniem.

Cytometr przepływowy mierzy rozproszenie światła i fluorescencję komórek. Umożliwia to zlokalizowanie istotnej populacji w ramach elektronicznego okna zdefiniowanego na histogramie, które koreluje z rozproszeniem światła w bok (Side Scatter, SS) oraz w osi wiązki (Forward Scatter, FS). Jako pomoc na etapie bramkowania można wykorzystać inne histogramy dwuparametrowe dostępne na cytometrze, w zależności od zastosowania wybranego przez użytkownika.

Fluorescencja odgraniczonych komórek jest analizowana w celu odróżnienia zdarzeń barwionych dodatnio od zdarzeń nieulegających barwieniu. Wyniki są wyrażane jako odsetek zdarzeń dodatnich względem wszystkich zdarzeń zarejestrowanych poprzez bramkowanie.

UŻYTKOWNIK DOCELOWY

Produkt jest przeznaczony do profesjonalnego użytku w laboratoriach.

PRÓBKİ

Próbki krwi żyłnej lub szpiku kostnego muszą być pobierane do sterylnych probówek zawierających antykoagulant w postaci soli EDTA lub ACD lub heparyny.

Próbki należy przechowywać w temperaturze pokojowej (18 – 25°C), bez wstrząsania. Przed pobraniem próbki testowej materiał należy poddać homogenizacji przez łagodne wymieszanie.

Próbki muszą zostać zbadane w ciągu 24 godzin od pobrania krwi żyłnej przez nakłucie.

OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Nie używać odczynników po upływie daty ważności.
2. Nie zamrażać.
3. Maksymalnie ograniczyć narażenie na działanie światła.
4. Nie dopuścić do skażenia mikrobiologicznego odczynników, gdyż może to spowodować uzyskanie fałszywych wyników.
5. Odczynnik 1 zawiera formaldehyd. Formaldehyd jest toksyczny i alergogenny. Jest uznawany za środek rakotwórczy.
6. Odczynnik 2 zawiera Azydek sodu (NaN_3). Należy go traktować ostrożnie. Nie połykać, unikać kontaktu ze skórą, śluzówkami i oczami. W środowisku kwaśnym azydek sodu może tworzyć potencjalnie niebezpieczny kwas azotowodorowy. W przypadku konieczności utylizacji zaleca się rozcieńczenie odczynnika dużą ilością wody przed wylaniem go do kanalizacji, co umożliwi uniknięcie akumulacji azydku sodu w metalowych rurach i zapobieganie wybuchom.

7. Wszystkie próbki krwi należy uważać za potencjalnie zakaźne i obchodzić się z nimi ostrożnie (w szczególności nosić ochronne rękawice, fartuchy i okulary).
8. Nigdy nie wolno pipetować ustami. Nie dopuszczać do kontaktu próbek ze skórą, błonami śluzowymi i oczami.
9. Probówki przeznaczone na krew i materiały jednorazowego użytku używane podczas procedury należy usuwać do pojemników ad hoc przeznaczonych do spalania.
10. Odczynniki i odpady należy usuwać zgodnie z wymogami lokalnymi.

KLASYFIKACJA ZAGROŻEŃ WG GHS

Odczynnik 1: utrwalenie NIEBEZPIECZEŃSTWO



H302	Działa szkodliwie po połknięciu.
H313	Może działać szkodliwie w kontakcie ze skórą.
H314	Powoduje ciężkie oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
H341	Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.
H350	Może powodować raka.
H370	Powoduje uszkodzenie narządów.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne, odzież ochronną i ochronę oczu/ochronę twarzy.
P303+P361+P353	W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Spłukać skórę pod strumieniem wody.
P305+P351+P338	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P310	Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. Metanol 1 - 2% Formaldehyd 5 - 10%



Karta charakterystyki jest dostępna pod adresem beckman.com/techdocs

MAGAZYNOWANIE I STABILNOŚĆ

Odczynnik IntraPrep należy przechowywać w temperaturze 18 – 25°C.

Stabilność zamkniętej fiolki: odczynnik jest stabilny przez 517 dni.

Stabilność otwartej fiolki: odczynnik zachowuje stabilność przez 90 dni.

Zobacz świadectwo analizy właściwe dla serii pod adresem www.beckman.com.

OZNAKA POGORSZENIA WŁAŚCIWOŚCI

Wszelkie zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników mogą wskazywać na pogorszenie właściwości — odczynników takich nie należy używać.

W celu otrzymania dodatkowych informacji lub w przypadku otrzymania uszkodzonego produktu należy skontaktować się z działem obsługi klienta firmy Beckman Coulter pod numerem telefonu 800-742-2345 (USA lub Kanada) lub z miejscowym przedstawicielem firmy Beckman Coulter.

ZAWARTOŚĆ

Środek konserwujący, azydek sodu, może tworzyć związki wybuchowe w metalowych rurach kanalizacyjnych. Patrz NIOSH Bulletin (Biuletyn instytutu NIOSH): Explosive Azide Hazard (Niebezpieczeństwo wybuchu azydu) (16.8.76).

Po usunięciu nierozcieńczonego odczynnika należy przepłukać rury ściekowe wodą, aby uniknąć gromadzenia się azydów. Azyd sodu musi być usuwany zgodnie z odpowiednimi przepisami lokalnymi.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE Z ZESTAWEM:

- Probówki do pobierania próbek i materiały wymagane do pobierania próbek.
- Pipety automatyczne z końcówkami jednorazowymi na 10, 20, 50, 100 i 500 μL .
- Probówki z tworzywa sztucznego przeznaczone do hemolizy.
- Swoiste przeciwciała monoklonalne (mAb).
- Kontrola ujemna.
- Odczynnik do utrwalania limfocytów. Przykład: Roztwór utrwalający IOtest 3 (nr ref. A07800).
- Bufor (PBS: 0,01 M fosforan sodu; 0,145 M chlorek sodu; pH 7,2).
- Wirówka.
- Mieszadło automatyczne (typu worteks).
- Cytometr przepływowy.

PROCEDURA

A - Odczyn wewnątrzkomórkowy

Liczba erytrocytów obecnych w próbce powinna być mniejsza niż 6×10^6 na μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). W razie potrzeby rozcieńczyć PBS.

Liczba leukocytów obecnych w próbce powinna być mniejsza niż $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). W razie potrzeby rozcieńczyć PBS.

W przypadku każdej badanej próbki oprócz próbki testowej można dodać jedną próbkę kontrolną, w której komórki są mieszane w obecności kontroli ujemnej, odpowiednio do wybranego barwienia swoistego.

1. Do każdej próbki dodać 50 μL próbki badanej.
2. Do każdej próbki dodać 100 μL odczynnika 1. Bezpośrednio po każdym dodaniu energicznie worteksować.
3. Inkubuj 15 minut w temperaturze pokojowej ($18 - 25^\circ\text{C}$).
4. Dodać po 4 mL PBS do każdej próbki.
5. Wiruj przez 5 minut przy 300 x g w temperaturze pokojowej.
6. Usunąć supernatant poprzez zasysanie.
7. Do każdej próbki dodać 100 μL odczynnika 2. NIE WORTEKSOWAĆ, pozostawić odczynnik 2 do naturalnego rozproszenia w osadzie komórkowym.
8. Inkubuj 5 minut w temperaturze pokojowej ($18 - 25^\circ\text{C}$) BEZ WSTRZĄSANIA.
9. Wstrząsaj lekko dłonią przez 2 – 3 sekundy.
10. Dodać niezbędną ilość przeciwciała monoklonalnego (swoistego dla wewnątrzcytoplazmatycznej determinanty antygenowej) do każdej próbki testowej i w razie potrzeby odpowiednią ilość kontroli ujemnej do każdej próbki kontrolnej.
11. Łagodnie wymieszaj próbki mikserem Vortex.
12. Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej ($18-25^\circ\text{C}$), chroniąc przed światłem.
13. Dodać po 4 mL PBS do każdej próbki.
14. Wiruj przez 5 minut przy 300 x g w temperaturze pokojowej.
15. Odciągnij nadsącz i zawieś komórki w 0,5 lub 1 mL utrwalacza IOtest 3 Fixative Solution (Odn. A07800) w stężeniu roboczym (1X). Utrwalone tak preparaty można przechowywać przez 24 godziny w temperaturze $2 - 8^\circ\text{C}$, bez dostępu światła.

B - Odczyn wewnątrzkomórkowy i błonowy

Liczba erytrocytów obecnych w próbce powinna być mniejsza niż 6×10^6 na μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). W razie potrzeby rozcieńczyć PBS.

Liczba leukocytów w próbce powinna być mniejsza niż $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). W razie potrzeby rozcieńczyć PBS.

W przypadku każdej badanej próbki oprócz próbki testowej można dodać jedną próbkę kontrolną, w której komórki są mieszane w obecności kontroli ujemnej, odpowiednio do wybranego barwienia swoistego.

1. Do każdej próbki dodać 50 μL próbki badanej.
2. Dodać niezbędną ilość przeciwciała monoklonalnego (swoistego dla błonowej determinanty antygenowej) do każdej próbki testowej i w razie potrzeby dodać odpowiednią ilość kontroli ujemnej do każdej próbki kontrolnej.
3. Łagodnie wymieszaj próbki mikserem Vortex.

4. Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej (18–25°C), chroniąc przed światłem.
5. Do każdej probówki dodać 100 µL odczynnika 1. Bezpośrednio po każdym dodaniu energicznie worteksować.
6. Inkubuj 15 minut w temperaturze pokojowej (18 – 25°C).
7. Dodać po 4 mL PBS do każdej probówki.
8. Wiruj przez 5 minut przy 300 x g w temperaturze pokojowej.
9. Usunąć supernatant poprzez zasysanie.
10. Do każdej probówki dodać 100 µL odczynnika 2. NIE WORTEKSOWAĆ, pozostawić odczynnik 2 do naturalnego rozproszenia w osadzie komórkowym.
11. Inkubuj 5 minut w temperaturze pokojowej (18 – 25°C) BEZ WSTRZĄSANIA.
12. Wstrząsaj lekko dłonią przez 2 – 3 sekundy.
13. Dodać niezbędną ilość przeciwciała monoklonalnego (swoistego dla wewnątrzcytoplazmatycznej determinanty antygenowej) do każdej probówki testowej i w razie potrzeby odpowiednią ilość kontroli ujemnej do każdej probówki kontrolnej.
14. Do każdej z probówek kontrolnych dodaj 20 µL kontroli izotypowej.
15. Łagodnie wymieszaj probówki mikserem Vortex.
16. Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej (18–25°C), chroniąc przed światłem.
17. Dodać po 4 mL PBS do każdej probówki.
18. Wiruj przez 5 minut przy 300 x g w temperaturze pokojowej.
19. Odciągnij nadsącz i zawieś komórki w 0,5 lub 1 mL utrwalacza IOTest 3 Fixative Solution (Odn. A07800) w stężeniu roboczym (1X). Utrwalone tak preparaty można przechowywać przez 24 godziny w temperaturze 2 – 8°C, bez dostępu światła.

WYDAJNOŚĆ

Dane dotyczące wydajności uzyskano z wykorzystaniem procedury opisanej powyżej na próbkach krwi mających mniej niż 24 godziny, uprzednio pobranych do sterylnych probówek z solą EDTA jako antykoagulantem. Badanie przeprowadzono w ciągu 2 godzin po barwieniu immunologicznym.

PRECYZJA

Odsetek wartości dodatnich określono przy użyciu krwi pełnej i szpiku kostnego. Każdą próbkę analizowano 4 razy, dwa razy dziennie przez 1 dzień, za pomocą 2 analizatorów, przy użyciu 2 serii odczynnika permeabilizującego IntraPrep. Pomiar (% dodatnich) przeprowadzono na cytometrze przepływowym Navios. Badanie przeprowadzono na podstawie metody opisanej w wytycznych CLSI w dokumencie EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Ocena wydajności precyzji metody pomiarów ilościowych).

Nasze kryteria akceptacji są uzależnione od liczby zdarzeń dodatnich zmierzonych w każdej populacji:

- Jeśli zdarzenie dodatnie < 1500, WZ < 15%
- Jeśli zdarzenie dodatnie > 1500, WZ < 10%

Krew pełna z EDTA:

Barwienie błonowe CD45/CD14 = czystość limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 8877							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie błonowe CD45/CD14 = odzysk limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 8877							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w monocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 1070							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w granulocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 13246							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Krew pełna z HEPARYNA:

Barwienie błonowe CD45/CD14 = czystość limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 6824							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie błonowe CD45/CD14 = odzysk limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 6824							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w monocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 961							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w granulocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 20742							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Krew pełna z ACD:

Barwienie błonowe CD45/CD14 = czystość limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 12355							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie błonowe CD45/CD14 = odzysk limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 12355							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w monocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 1483							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w granulocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 32715							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Szpic kostny z EDTA:

Barwienie błonowe CD45/CD14 = czystość limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 8808							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie błonowe CD45/CD14 = odzysk limfocytów							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 8808							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w monocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 2212							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Barwienie wewnątrzcytoplazmatyczne w granulocytach za pomocą anty-mieloperoksydazy-FITC							
Liczba zdarzeń dodatnich (średnia) = 33181							
	Między operatorami	Między cytometrami	W ramach serii	Między seriami	Między oznaczeniami	W ramach analizy	Łącznie
WZ (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
WYNIKI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CZYSTOŚĆ I ODZYSK LIMFOCYTÓW

Czystość i odzysk limfocytów oceniano zgodnie z zaleceniami CDC (5). Krew od 10 zdrowych dawców pobraną do EDTA, heparyny i ACD oraz 5 próbek szpiku kostnego oznakowano mieszaniną przeciwciał monoklonalnych CD45-FITC i CD14-PE. Wartości średnie odzysku i czystości oraz zakres podano w poniższych tabelach:

Krew pełna z EDTA		
Parametr	Odzysk	Czystość
Średnia	93,6	89,7
Min./Maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Krew pełna z HEPARYNĄ		
Parametr	Odzysk	Czystość
Średnia	94,3	87,6
Min./Maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Krew pełna z ACD		
Parametr	Odzysk	Czystość
Średnia	94,2	94,6
Min./Maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Szpic kostny z EDTA		
Parametr	Odzysk	Czystość
Średnia	80,7	71,8
Min./Maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

ORGANICZENIA

1. Wyniki cytometrii przepływowej mogą być zafałszowane, jeśli osiowanie cytometru nie było dokładne, przepuszczona fluorescencja nie została prawidłowo skompensowana, a regiony nie zostały starannie upozycjonowane.
2. Pewne determinanty antygenowe mogą być wrażliwe na działanie formaldehydu lub saponiny. Każde laboratorium musi zweryfikować warunki stosowania przeciwciał monoklonalnych.
3. Uzyskane wyniki będą dokładne i odtwarzalne pod warunkiem, że stosowane będą procedury zgodne z informacjami zawartymi w ulotce z danymi technicznymi oraz z dobrymi praktykami laboratoryjnymi.
4. Odczynnik został zoptymalizowany tak, by oferować najlepszy stosunek sygnału swoiste/nieswoiste. W związku z tym ważne jest przestrzeganie w każdym teście stosunku objętości odczynnika i liczby leukocytów oraz erytrocytów.

5. W przypadku hiperkomórkowości rozcieńczyć materiał w PBS tak, by uzyskać mniej niż 5×10^9 leukocytów/L i mniej niż 6×10^{12} erytrocytów/L (6).
6. W niektórych stanach chorobowych, takich jak ciężka niewydolność nerek lub hemoglobinopatie, liza krwinek czerwonych może być powolna, niepełna lub nawet niemożliwa. W takich przypadkach przed barwieniem zalecane jest wyizolowanie komórek jednojądrzastych na gradiencie gęstości (na przykład Ficoll) (7).

Przykłady i piśmiennictwo można znaleźć w załączniku.

ZNAKI TOWAROWE

Beckman Coulter, stylizowane logo oraz wymienione w tym dokumencie znaki produktów i usług firmy Beckman Coulter są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Beckman Coulter, Inc. w Stanach Zjednoczonych i innych krajach.

DODATKOWE INFORMACJE

Dotyczy pacjentów/użytkowników/stron trzecich w Unii Europejskiej i w krajach o identycznym systemie regulacyjnym (rozporządzenie 2017/746/UE w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro) — jeśli podczas lub w wyniku korzystania z tego wyrobu wystąpi poważny incydent, należy zgłosić go producentowi i/lub jego upoważnionemu przedstawicielowi oraz odpowiedniemu organowi krajowemu.

HISTORIA ZMIAN

WERSJA AF:	Data wydania: Styczeń 2021 r.
WERSJA AW:	
Aktualizacje w celu zapewnienia zgodności z globalnymi zasadami oznakowania firmy Beckman Coulter i według wymogów rozporządzenia IVD-R (UE)2017/746:	
Dodano części	Przewidziany użytkownik, Precyzja, Odzysk i czystość limfocytów, Informacje dodatkowe, Historia zmian
Dodano informacje	Zobacz części Ostrzeżenie i środki ostrożności, Przechowywanie i stabilność, Ograniczenia
Zaktualizowane części	Ostrzeżenie i środki ostrożności, Klasyfikacja zagrożeń GHS, Przechowywanie i stabilność, Dowody pogorszenia jakości, Procedura, Działanie
Usunięte części	Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

Legenda symboli

Słowniczek symboli jest dostępny pod adresem beckman.com/techdocs (numer dokumentu B60062)

	Činidlo 1	Činidlo 2
	Fixační činidlo	Permeabilizační činidlo
Forma	Roztok	Roztok
Aktivní látka	Formaldehyd	Saponin
Díl	5 ml	5 ml
Počet lahviček	3 lahvičky	3 lahvičky
Objem / test	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testů; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml / test

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

URČENÉ POUŽITÍ

IntraPrep obsahuje dvě reagentie připravené k použití, které způsobují permeabilizaci cytoplazmatické membrány leukocytů. Toho se využívá při průkazu intracelulárních antigenních determinant pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek. IntraPrep je určen k přípravě biologických vzorků při analýze průtokovým cytometrem. Reagentie byly optimalizovány tak, aby nespecifické značení u tohoto typu analýzy bylo minimální (1,2,3,4).

PRINCIP

V prvním kroku jsou buňky fixovány pomocí reagentie 1. Po promytí je účinkem reagentie 2 navozena permeabilizace a jsou lyzovány zbývající erytrocyty. Během tohoto kroku jsou k buňkám přidány konjugované monoklonální protilátky specifické pro intracelulární antigenní determinanty a leukocyty jsou poté analyzovány průtokovým cytometrem.

Tímto způsobem je možné provádět i průkaz povrchových antigenních determinant. V tomto případě jsou buňky inkubovány se specifickými konjugovanými monoklonálními protilátkami před fixací.

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

Fluorescence oddělených buněk je analyzována s cílem odlišit pozitivně obarvené události od neobarvených. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentní podíl pozitivních událostí ze všech událostí zjištěných gatováním.

ZAMÝŠLENÝ UŽIVATEL

Tento produkt je určen pro profesionální laboratorní použití.

VZORKY

Vzorky žilní krve nebo kostní dřeně musí být odebrány do sterilních zkumavek obsahujících sůl EDTA, ACD nebo heparin jako antikoagulační činidlo.

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

Vzorky je nutné analyzovat do 24 hodin od venepunkce.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Reagentii nepoužívejte po datu expirace.
2. Nezmrazujte.
3. Minimalizujte expozici světlu.
4. Zabraňte mikrobiologické kontaminaci reagentií, jinak mohou být výsledky chybné.
5. Reagentie 1 obsahuje formaldehyd. Formaldehyd je toxický a alergenní. Má se za to, že je to karcinogenní látka.
6. Reagentie 2 obsahuje azid sodný (NaN_3), proto s ní musí být zacházeno opatrně. Nepoužívejte vnitřně a vyvarujte se kontaktu reagentie s pokožkou, sliznicemi a očima. V kyselém prostředí může z azidu sodného vznikat potenciálně nebezpečná hydrazidová kyselina. Pokud je třeba reagentii zlikvidovat, doporučuje se naředit ji před vylitím do odpadu velkým množstvím vody, aby se předešlo nahromadění azidu v kovovém potrubí a tím i riziku exploze.
7. Všechny vzorky krve je nutno považovat za potenciálně infekční a je nutné manipulovat s nimi opatrně (zvláště: používat ochranné rukavice, pláště a brýle).
8. Nikdy nepipetujte ústy a zabraňte tomu, aby se vzorky dostaly do kontaktu s kůží, sliznicí ani očima.

9. Zkumavky s krví a jednorázový materiál určený pro manipulaci je třeba likvidovat v kontejnerech ad hoc určených ke spálení.

10. Reagencie a odpad by měly být odstraňovány v souladu s místními požadavky.

KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Činidlo 1: Fixace

NEBEZPEČÍ



H302	Zdraví škodlivý při požití.
H313	Může škodit zdraví při styku s pokožkou.
H314	Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
H341	Podezření na genetické poškození.
H350	Může vyvolat rakovinu.
H370	Způsobuje poškození orgánů.
P201	Před použitím si obzarejte speciální instrukce.
P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.
P303+P361+P353	PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Opláchněte kůži vodou.
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P310	Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. Methanol 1 - 2 % Formaldehyd 5 - 10 %



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

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

IntraPrep je třeba uchovávat při 18 – 25 °C.

Stabilita uzavřené lahvičky: reagencie je stabilní po dobu 517 dnů.

Stabilita již jednou otevřené lahvičky: reagencie je stabilní po dobu 90 dní.

Viz certifikát o analýze specifický pro šarži na www.beckman.com.

ZNÁMKY ZHORŠENÍ KVALITY

Jakákoli změna fyzického vzhledu reagentů může znamenat jejich znehodnocení a taková reagenty by se neměla používat.

Pokud potřebujete další informace nebo jste obdrželi poškozený produkt, zavolejte na telefonní číslo zákaznické služby společnosti Beckman Coulter 800-742-2345 (USA nebo Kanada) nebo se obraťte na místního zástupce společnosti Beckman Coulter.

OBSAH

Konzervační látka azid sodný může v kovovém odpadním potrubí vytvářet výbušné sloučeniny. Viz bulletin NIOSH: Explosive Azide Hazard (Nebezpečí výbušných azidů) (16.8.76).

Po vypuštění neředěné reagenty propláchněte odpadní potrubí vodou, aby se v něm nehromadily azidové sloučeniny. Likvidace azidu sodného musí být prováděna podle příslušných místních předpisů.

MATERIÁLY POTŘEBNÉ, ALE NEDODANÉ SE SOUPRAVOU:

- Zkumavky na odběr vzorků a materiál potřebný k odběru vzorků.
- Automatické pipety s výměnnými špičkami k dávkování objemů 10, 20, 50, 100 a 500 µl.

- Plastové zkumavky na hemolýzu.
- Specifické monoklonální protilátky (mAb).
- Negativní kontroly.
- Reagencie pro fixaci leukocytů. Například: Fixační roztok IOTest 3 (ref. A07800).
- Pufr (PBS: 0,01 M fosforečnan sodný; 0,145 M chlorid sodný; pH 7,2).
- Odstředivka.
- Automatické míchadlo (typu vortex).
- Průtokový cytometr.

POSTUP

A - Nitrobuněčné cytoplazmatické značení

Počet červených krvinek ve vzorku by měl být menší než 6×10^6 na μl ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). V případě nutnosti vzorek naředte PBS.

Počet leukocytů ve vzorku by měl být menší než 5×10^3 μl ($5 \times 10^9/\text{L}$). V případě nutnosti vzorek naředte PBS.

Pro každý analyzovaný vzorek lze kromě testovací zkumavky přidat jednu kontrolní zkumavku, v níž jsou buňky promíchány v přítomnosti negativní kontroly odpovídající konkrétnímu zvolenému barvení.

1. Přidejte 50 μl testovaného vzorku do každé zkumavky.
2. Přidejte 100 μl reagentie 1 do každé zkumavky. Po každém přidání ihned důkladně promíchejte na vortexové míchačce.
3. Inkubujte 15 min při laboratorní teplotě (18 – 25 °C).
4. Do každé zkumavky přidejte 4 ml PBS.
5. Centrifugujte 5 minut při 300 x g při laboratorní teplotě.
6. Supernatant odsajte.
7. Přidejte 100 μl reagentie 2 do každé zkumavky. **NEMÍCHEJTE NA VORTEXOVÉ MÍCHAČCE**, nechte reagentii 2 přirozeně difundovat do buněčné pelety.
8. Inkubujte 5 min při laboratorní teplotě (18 – 25 °C) **BEZ MÍCHÁNÍ**.
9. Vzorky jemně manuálně promíchejte po 2 až 3 sekundy.
10. Přidejte nezbytné množství mAb (specifické pro intracytoplazmatickou antigenní determinantu) do každé testovací zkumavky, a pokud je to nutné, přidejte vhodné množství negativní kontroly do každé kontrolní zkumavky.
11. Zkumavky jemně promíchejte na vortexu.
12. Provádějte inkubaci po dobu 15 minut při pokojové teplotě (18–25 °C), chraňte před světlem.
13. Do každé zkumavky přidejte 4 ml PBS.
14. Centrifugujte 5 minut při 300 x g při laboratorní teplotě.
15. Odsajte supernatant a resuspendujte buněčnou peletu v 0,5 ml nebo 1 ml fixačního roztoku IOTest 3 Fixative Solution naředěného na pracovní koncentraci (1x). Takto fixované vzorky je možno uchovávat při 2 až 8 °C bez přístupu světla po 24 hodin.

B – Nitrobuněčné cytoplazmatické a membránové značení

Počet červených krvinek ve vzorku by měl být menší než 6×10^6 na μl ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). V případě nutnosti vzorek naředte PBS.

Počet leukocytů ve vzorku by měl být menší než 5×10^3 μl ($5 \times 10^9/\text{L}$). V případě nutnosti vzorek naředte PBS.

Pro každý analyzovaný vzorek lze kromě testovací zkumavky přidat jednu kontrolní zkumavku, v níž jsou buňky promíchány v přítomnosti negativní kontroly odpovídající konkrétnímu zvolenému barvení.

1. Přidejte 50 μl testovaného vzorku do každé zkumavky.
2. Přidejte nezbytné množství mAb (specifické pro membránovou antigenní determinantu) do každé testovací zkumavky, a pokud je to nutné, přidejte vhodné množství negativní kontroly do každé kontrolní zkumavky.
3. Zkumavky jemně promíchejte na vortexu.
4. Provádějte inkubaci po dobu 15 minut při pokojové teplotě (18–25 °C), chraňte před světlem.
5. Přidejte 100 μl reagentie 1 do každé zkumavky. Po každém přidání ihned důkladně promíchejte na vortexové míchačce.
6. Inkubujte 15 min při laboratorní teplotě (18 – 25 °C).
7. Do každé zkumavky přidejte 4 ml PBS.
8. Centrifugujte 5 minut při 300 x g při laboratorní teplotě.
9. Supernatant odsajte.

10. Přidejte 100 µl reagentie 2 do každé zkumavky. NEMÍCHEJTE NA VORTEXOVÉ MÍCHAČCE, nechte reagentii 2 přirozeně difundovat do buněčné pelety.
11. Inkubujte 5 min při laboratorní teplotě (18 – 25 °C) BEZ MÍCHÁNÍ.
12. Vzorky jemně manuálně promíchejte po 2 až 3 sekundy.
13. Přidejte nezbytné množství mAb (specifické pro intracytoplazmatickou antigenní determinantu) do každé testovací zkumavky, a pokud je to nutné, přidejte vhodné množství negativní kontroly do každé kontrolní zkumavky.
14. Do každé kontrolní zkumavky přidejte 20 µl izotypové kontroly.
15. Zkumavky jemně promíchejte na vortexu.
16. Provádějte inkubaci po dobu 15 minut při pokojové teplotě (18–25 °C), chraňte před světlem.
17. Do každé zkumavky přidejte 4 ml PBS.
18. Centrifugujte 5 minut při 300 x g při laboratorní teplotě.
19. Odsajte supernatant a resuspendujte buněčnou peletu v 0,5 ml nebo 1 ml fixačního roztoku IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) naředěného na pracovní koncentraci (1x). Takto fixované vzorky je možno uchovávat při 2 až 8 °C bez přístupu světla po 24 hodin.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Data o výkonu se získávají výše popsaným postupem na vzorcích krve starých méně než 24 hodin, které byly odebrány do sterilních zkumavek se solí EDTA jakožto antikoagulačním činidlem. Analýza se provádí do 2 hodin od imunobarvení.

PRECIZNOST

Procentuální pozitivní hodnoty byly stanoveny pomocí plné krve a kostní dřeně. Každý vzorek byl analyzován 4krát, dvakrát denně v průběhu 1 dne na 2 přístrojích pomocí 2 šarží permeabilizační reagentie IntraPrep. Měření (% pozitivních) byla provedena na průtokovém cytometru Navios. Analýza byla provedena na základě metody CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Vyhodnocení výkonu preciznosti kvantitativních měřicích metod).

Naše kritéria přijatelnosti závisí na počtu pozitivních událostí změřených pro každou populaci:

- Pokud pozitivní událost < 1 500, VK < 15 %
- Pokud pozitivní událost > 1 500, VK < 10 %

Plná krev s EDTA:

Membránové barvení CD45/CD14 = čistota lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 8877							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové barvení CD45/CD14 = výtěžek lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 8877							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na monocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 1070							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na granulocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 13246							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Plná krev s HEPARINEM:

Membránové barvení CD45/CD14 = čistota lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 6824							

	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové barvení CD45/CD14 = výtěžek lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 6824							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na monocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 961							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na granulocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 20742							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Plná krev s ACD:

Membránové barvení CD45/CD14 = čistota lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 12355							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové barvení CD45/CD14 = výtěžek lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 12355							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na monocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 1483							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na granulocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 32715							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Kostní dřev s EDTA:

Membránové barvení CD45/CD14 = čistota lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 8808							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové barvení CD45/CD14 = výtěžek lymfocytů							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 8808							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

VK (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na monocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 2212							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-myeloperoxidáza-FITC intracytoplazmatické barvení na granulocytech							
Počet pozitivních událostí (průměr) = 33181							
	Mezi obslužnými pracovníky	Mezi cytometry	V rámci šarže	Mezi šaržemi	Mezi cykly	V rámci cyklu	Celkem
VK (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ČISTOTA A VÝTĚŽEK LYMFOCYTŮ

Čistota a výtěžek lymfocytů byly vyhodnoceny podle doporučení CDC (5). Krev 10 zdravých dárců odebraná do EDTA, heparinu a ACD a 5 vzorků kostní dřeně bylo označeno směsí monoklonálních protilátek CD45-FITC a CD14-PE. Průměrné hodnoty a výtěžek a čistota s rozsahy jsou uvedeny v následujících tabulkách:

Plná krev s EDTA		
Parametr	Výtěžek	Čistota
Průměr	93,6	89,7
Min./max.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Plná krev s HEPARINEM		
Parametr	Výtěžek	Čistota
Průměr	94,3	87,6
Min./max.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Plná krev s ACD		
Parametr	Výtěžek	Čistota
Průměr	94,2	94,6
Min./max.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Kostní dřeň s EDTA		
Parametr	Výtěžek	Čistota
Průměr	80,7	71,8
Min./max.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

OMEZENÍ

1. Průtoková cytometrie může přinést falešné výsledky, pokud cytometr nebyl dokonale seřizen, pokud nebyly správně kompenzovány úniky fluorescence a pokud oblasti nebyly pečlivě umístěny.
2. Určité antigenní determinanty mohou být účinkem formaldehydu nebo saponinu porušeny. Podmínky pro použití monoklonálních protilátek musí každá laboratoř ověřit individuálně.
3. Přesných a reprodukovatelných výsledků bude dosaženo, pokud jsou použité postupy v souladu s technickým příbalovým letákem a se správnou laboratorní praxí.
4. Reagencie byla optimalizována tak, aby poskytovala co nejlepší poměr specifického signálu k nespecifickému. Z tohoto důvodu je důležité v každém testu dodržovat poměr mezi objemem reagencie a počtem leukocytů a erytrocytů.
5. V případě nadbytku buněk naředte vzorek PBS tak, aby koncentrace byla menší než 5×10^9 leukocytů/L a menší než 6×10^{12} červených krvinek/L (6).
6. U určitých chorob, například závažného selhání ledvin či hemoglobinopatií, se může stát, že lýza červených krvinek bude probíhat pomalu, nedokončí se, nebo dokonce nebude možná. V tomto případě se před značením doporučuje izolovat mononukleární buňky s použitím hustotního gradientu (např. Ficoll) (7).

Příklady a reference jsou uvedeny v příloze.

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.

DALŠÍ INFORMACE

Pro pacienty, uživatele nebo třetí osoby v Evropské unii a v zemích se stejným regulačním režimem (nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro); pokud při používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání dojde k závažné nehodě, prosím ohlaste tuto nehodu výrobci a/nebo jeho oprávněnému zástupci a kompetentnímu vnitrostátnímu orgánu.

HISTORIE REVIZÍ

REVIZE AF:	Datum uvolnění: leden 2021
REVIZE AW:	
Aktualizace kvůli shodě s globálními zásadami označování společnosti Beckman Coulter a dle požadavků IVD-R (EU) 2017/746:	
Přidání částí	Určený uživatel, Preciznost, Výtěžek a čistota lymfocytů, Další informace, Historie revizí
Přidány informace	Viz části Varování a opatření, Skladování a stabilita, Omezení
Aktualizované části	Varování a opatření, Klasifikace nebezpečí podle GHS, Skladování a stabilita, Znamky znehodnocení, Postup, Charakteristika
Odstranění částí	Reprodukovatelnost v rámci laboratoře

Klíč k symbolům

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

	Činidlo 1	Činidlo 2
	Fixačné činidlo	Permeabilizačné činidlo
Forma	Roztok	Roztok
Aktívna látka	Formaldehyd	Saponin
Objem	5 ml	5 ml
Počet fľaštičiek	3 fľaštičky	3 fľaštičky
Objem / test	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testov; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml / test

Na diagnostické použitie *in vitro*

URČENÉ POUŽITIE

IntraPrep obsahuje dve reagencie pripravené na použitie, ktoré spôsobujú permeabilizáciu cytoplazmatickej membrány leukocytov. Toho sa využíva pri preukázaní intracelulárnych antigénnych determinant pomocou fluorescenčne značených monoklonálnych protilátok. IntraPrep je určený na prípravu biologických vzoriek pri analýze prietokovým cytometrom. Reagencie boli optimalizované tak, aby nešpecifické značenie pri tomto type analýzy bolo minimálne (1,2,3,4).

PRINCÍP

V prvom kroku sú bunky fixované pomocou reagentie 1. Po premytí je účinkom reagentie 2 navodená permeabilizácia a sú lyzované zostávajúce erytrocyty. Počas tohto kroku sú k bunkám pridané konjugované monoklonálne protilátky špecifické pre intracelulárne antigénne determinanty a leukocyty sú potom analyzované prietokovým cytometrom.

Týmto spôsobom je možné vykonávať i preukázanie povrchových antigénnych determinant. V tomto prípade sú bunky inkubované so špecifickými konjugovanými monoklonálnymi protilátkami pred fixáciou.

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.

Fluorescencia vymedzených buniek sa analyzuje s cieľom odlíšiť pozitívne sfarbené udalosti od nesfarbených. Výsledky sú vyjadrené ako percento pozitívnych udalostí vzhľadom na všetky udalosti zaznamenané gatingom.

URČENÝ POUŽÍVATEĽ

Tento produkt je určený na profesionálne laboratórne použitie.

VZORKY

Vzorky žilnej krvi alebo kostnej drene musia byť odobraté do sterilných skúmaviek, ktoré obsahujú ako antikoagulačné činidlo soľ EDTA, ACD alebo heparín.

Vzorky by mali byť uchovávané bez miešania pri laboratórnej teplote (18 - 25 °C). Pred odoberaním vzoriek z odberovej skúmavky do testovacích skúmaviek je potrebné vzorky jemne premiešať.

Vzorky sa musia analyzovať do 24 hodín od odberu.

VÝSTRAHA A OPATRENIA

1. Činidlo nepoužívajte po dátume exspirácie.
2. Nezamrazujte.
3. Minimalizujte vystavenie svetlu.
4. Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii činidiel, inak môže dôjsť k falošným výsledkom.
5. Činidlo 1 obsahuje formaldehyd. Formaldehyd je toxický a alergénny. Považuje sa za karcinogénnu látku.
6. Reagentia 2 obsahuje azid sodný (NaN_3), preto s ňou musí byť zaobchádzané opatrne. Nepoužívajte vnútorne a vyvarujte sa kontaktu reagentie s pokožkou, sliznicami a očami. V kyslom prostredí môže z azidu sodného vzniknúť potenciálne nebezpečná hydrazidová kyselina. Pokiaľ je potrebné reagentiu zlikvidovať, odporúča sa nariediť ju pred vyliatím 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 preto sa s nimi musí narábať opatrne (predovšetkým: používajte ochranné rukavice, plášte a okuliare).
8. Nikdy nepipetujte ústami a zabráňte akémukoľvek kontaktu vzoriek s pokožkou, sliznicami a očami.

9. Skúmvky na krv a jednorazový materiál používané pri manipulácii sa musia zlikvidovať do schválených nádob určených na spálenie.

10. Činidlá a odpad by sa mali eliminovať v súlade s miestnymi požiadavkami.

KLASIFIKÁCIA RIZÍK PODĽA GHS

Činidlo 1: fixácia

NEBEZPEČENSTVO



H302	Škodlivý po požití.
H313	Pri kontakte s pokožkou môže byť škodlivý.
H314	Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí.
H317	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
H341	Podозrenie, že spôsobuje genetické poškodenie.
H350	Môže vyvolať rakovinu.
H370	Spôsobuje poškodenie orgánov.
P201	Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
P280	Noste ochranné rukavice, ochranný odev a ochranné okuliare/ochranu tváre.
P303+P361+P353	PRI KONTAKTE S POKOŽKOU (alebo vlasmi): Pokožku opláchnite vodou.
P305+P351+P338	PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.
P310	Okamžite volajte Národné toxikologické informačné centrum alebo lekára. Metanol 1 - 2 % Formaldehyd 5 - 10 %



Bezpečnostný list je dostupný na adrese beckman.com/techdocs

SKLADOVANIE A STABILITA

IntraPrep je potrebné uchovávať pri 18 - 25 °C.

Stabilita zatvorenej fľaštičky: činidlo je stabilné 517 dní.

Stabilita otvorenej fľaštičky: činidlo je stabilné 90 dní.

Pozrite si certifikát analýzy pre konkrétnu šaržu na adrese www.beckman.com.

ZNÁMKY ZNEHODNOTENIA

Akákoľvek zmena fyzického vzhľadu činidla môže svedčiť o zhoršení kvality a takéto činidlo by sa nemalo používať.

Ak potrebujete ďalšie informácie alebo ak je výrobok poškodený, kontaktujte stredisko zákazníckych služieb spoločnosti Beckman Coulter na telefónnom čísle 800-742-2345 (ak sa nachádzate v USA alebo Kanade) alebo kontaktujte miestneho zástupcu spoločnosti Beckman Coulter.

OBSAH

Konzervačné činidlo azid sodný môže v kovovej kanalizačnej sieti vytvárať výbušné zlúčeniny. Pozrite si informačný bulletin NIOSH: Explosive Azide Hazard (Nebezpečenstvo výbušného azidu) (16. 8. 76).

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:

- Vzorkovacie skúmvky a materiál potrebný na vzorkovanie.

- Automatické pipety s výmennými špičkami na dávkovanie objemov 10, 20, 50, 100 a 500 µl.
- Plastové hemolytické skúmavky.
- Špecifické monoklonálne protilátky (mAb).
- Negatívne kontroly.
- Činidlo na fixáciu leukocytov. Napríklad: fixačný roztok IOTest 3 (Ref. A07800).
- Tlmiaci roztok (PBS: fosforečnan sodný 0,01 M; chlorid sodný 0,145 M; pH 7,2).
- Centrifúga.
- Automatické miešadlo (typ Vortex).
- Prietokový cytometer.

POSTUP

A - Vnútro bunkové cytoplazmatické značenie

Počet červených krviniek vo vzorke by malo byť menšie než 6×10^6 na µl ($6 \times 10^{12}/L$). V prípade nutnosti vzorku nariedte PBS.

Počet leukocytov vo vzorke by mal byť menší než 5×10^3 µl ($5 \times 10^9/L$). V prípade nutnosti vzorku nariedte PBS.

Na každú analyzovanú vzorku sa okrem testovacej skúmavky môže pridať aj jedna kontrolná skúmavka, v ktorej sa zmiešajú bunky v prítomnosti negatívnej kontroly zodpovedajúcej konkrétnemu zvolenému farbeniu.

1. Do každej skúmavky pridajte 50 µl testovanej vzorky.
2. Do každej skúmavky pridajte 100 µl činidla 1. Po každom pridaní dôkladne vortexujte.
3. Inkubujte 15 min pri laboratórnej teplote (18 - 25 °C).
4. Do každej skúmavky pridajte 4 ml PBS.
5. Centrifugujte 5 minút pri 300 x g pri laboratórnej teplote.
6. Nasatím odoberte supernatant.
7. Do každej skúmavky pridajte 100 µl činidla 2. NEVORTEXUJTE, nechajte činidlo 2, aby prirodzene preniklo do bunkového peletu.
8. Inkubujte 5 min pri laboratórnej teplote (18 - 25 °C) BEZ MIEŠANIA.
9. Vzorky jemne manuálne premiešajte po 2 až 3 sekundy.
10. Do každej testovacej skúmavky pridajte potrebné množstvo protilátky mAb (špecifickej pre intracytoplazmatický antigénny determinant) a v prípade potreby pridajte do každej kontrolnej skúmavky príslušné množstvo negatívnej kontroly.
11. Skúmavky jemne premiešajte na vortexe.
12. Inkubujte 15 minút pri izbovej teplote (18 – 25 °C) bez prístupu svetla.
13. Do každej skúmavky pridajte 4 ml PBS.
14. Centrifugujte 5 minút pri 300 x g pri laboratórnej teplote.
15. Odsajte supernatant a resuspendujte bunkovú peletu v 0,5 ml alebo 1 ml fixačného roztoku IOTest 3 Fixative Solution nariedeného na pracovnú koncentráciu (1X). Takto fixované vzorky je možno uchovávať pri 2 až 8 °C bez prístupu svetla počas 24 hodín.

B - Vnútro bunkové cytoplazmatické a membránové značenie

Počet červených krviniek vo vzorke by mal byť menší než 6×10^6 na µl ($6 \times 10^{12}/L$). V prípade nutnosti vzorku nariedte PBS.

Počet leukocytov vo vzorke by mal byť menší než 5×10^3 µl ($5 \times 10^9/L$). V prípade nutnosti vzorku nariedte PBS.

Na každú analyzovanú vzorku sa okrem testovacej skúmavky môže pridať aj jedna kontrolná skúmavka, v ktorej sa zmiešajú bunky v prítomnosti negatívnej kontroly zodpovedajúcej konkrétnemu zvolenému farbeniu.

1. Do každej skúmavky pridajte 50 µl testovanej vzorky.
2. Do každej testovacej skúmavky pridajte potrebné množstvo protilátky mAb (špecifickej pre membránový antigénny determinant) a v prípade potreby pridajte do každej kontrolnej skúmavky príslušné množstvo negatívnej kontroly.
3. Skúmavky jemne premiešajte na vortexe.
4. Inkubujte 15 minút pri izbovej teplote (18 – 25 °C) bez prístupu svetla.
5. Do každej skúmavky pridajte 100 µl činidla 1. Po každom pridaní dôkladne vortexujte.
6. Inkubujte 15 min pri laboratórnej teplote (18 - 25 °C).
7. Do každej skúmavky pridajte 4 ml PBS.

8. Centrifugujte 5 minút pri 300 x g pri laboratórnej teplote.
9. Nasatím odoberte supernatant.
10. Do každej skúmavky pridajte 100 µl činidla 2. NEVORTEXUJTE, nechajte činidlo 2, aby prirodzene preniklo do bunkového peletu.
11. Inkubujte 5 min pri laboratórnej teplote (18 - 25 °C) BEZ MIEŠANIA.
12. Vzorky jemne manuálne premiešajte po 2 až 3 sekundy.
13. Do každej testovacej skúmavky pridajte potrebné množstvo protilátky mAb (špecifickej pre intracytoplazmatický antigénny determinant) a v prípade potreby pridajte do každej kontrolnej skúmavky príslušné množstvo negatívnej kontroly.
14. Do každej kontrolnej skúmavky pridajte 20 µl izotypovej kontroly.
15. Skúmavky jemne premiešajte na vortexe.
16. Inkubujte 15 minút pri izbovej teplote (18 – 25 °C) bez prístupu svetla.
17. Do každej skúmavky pridajte 4 ml PBS.
18. Centrifugujte 5 minút pri 300 x g pri laboratórnej teplote.
19. Odsajte supernatant a resuspendujte bunkovú peletu v 0,5 ml alebo 1 ml fixačného roztoku IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) nariadeného na pracovnú koncentráciu (1x). Takto fixované vzorky je možné uchovávať pri 2 až 8 °C bez prístupu svetla počas 24 hodín.

VÝKONNOSŤ

Údaje o výkonnosti boli získané pomocou vyššie opísaného postupu z menej ako 24 hodín starých vzoriek krvi odobraných do sterilných skúmaviek so soľou EDTA ako antikoagulačným činidlom. Analýza prebehla do 2 hodín od imunologického farbenia.

PRESNOSŤ

Percentuálne pozitívne hodnoty sa stanovili na plnej krvi a kostnej dreni. Každá vzorka sa spracovala 4-krát, dva razy denne počas 1 dňa na 2 prístrojoch pomocou 2 šarží permeabilizačného činidla IntraPrep. Merania (% pozitívnych) sa vykonávali na prietokovom cytometri Navios. Analýza sa vykonávala podľa metódy CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Hodnotenie zhodnosti pri metódach kvantitatívneho merania).

Naše kritériá prijateľnosti závisia od počtu pozitívnych udalostí nameraného v jednotlivých populáciách:

- Ak je pozitívnych udalostí < 1500, CV < 15 %
- Ak je pozitívnych udalostí > 1500, CV < 10 %

Plná krv s EDTA:

Membránové farbenie CD45/CD14 = Čistota lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 8877							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové farbenie CD45/CD14 = Výťažnosť lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 8877							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie monocytov protilátkou FITC proti myeloperoxydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 1070							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie granulocytov protilátkou FITC proti myeloperoxydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 13246							

	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Plná krv s HEPARÍNOM:

Membránové farbenie CD45/CD14 = Čistota lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 6824							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové farbenie CD45/CD14 = Výťažnosť lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 6824							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie monocytov protilátkou FITC proti myeloperoydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 961							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie granulocytov protilátkou FITC proti myeloperoydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 20742							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Plná krv s ACD:

Membránové farbenie CD45/CD14 = Čistota lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 12355							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové farbenie CD45/CD14 = Výťažnosť lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 12355							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie monocytov protilátkou FITC proti myeloperoydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 1483							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie granulocytov protilátkou FITC proti myeloperoydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 32715							

	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Kostná dreň s EDTA:

Membránové farbenie CD45/CD14 = Čistota lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 8808							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membránové farbenie CD45/CD14 = Výťažnosť lymfocytov							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 8808							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie monocytov protilátkou FITC proti myeloperoydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 2212							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracytoplazmatické farbenie granulocytov protilátkou FITC proti myeloperoydáze							
Počet pozitívnych udalostí (priemer) = 33181							
	Medzi operátormi	Medzi cytometrami	V rámci jednej šarže	Medzi šaržami	Medzi analýzami	V rámci jednej analýzy	Celkovo
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
VÝSLEDKY	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ČISTOTA A VÝŤAŽNOSŤ LYMFOCYTOV

Čistota a výťažnosť lymfocytov sa vyhodnotili podľa odporúčaní CDC (5). Vzorky krvi od 10 zdravých darcov odobraté do EDTA, heparínu a ACD a 5 vzoriek kostnej drene sa označili zmesou monoklonálnych protilátok CD45-FITC a CD14-PE. Priemerné hodnoty výťažnosti a čistoty, ako aj príslušné rozsahy, sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách:

Plná krv s EDTA		
Parameter	Výťažnosť	Čistota
Priemer	93,6	89,7
Min/Max	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Plná krv s HEPARÍNOM		
Parameter	Výťažnosť	Čistota
Priemer	94,3	87,6
Min/Max	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Plná krv s ACD		
Parameter	Výťažnosť	Čistota
Priemer	94,2	94,6
Min/Max	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Kostná dreň s EDTA		
Parameter	Výťažnosť	Čistota
Priemer	80,7	71,8
Min/Max	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

OBMEDZENIA

1. Prietoková cytometria môže vytvárať falošné výsledky, ak cytometer nie je správne zarovnaný, ak úniky fluorescencie nie sú správne kompenzované, alebo ak nie sú oblasti správne umiestnené.

2. Určité antigénne determinanty môžu byť účinkom formaldehydu alebo saponínu porušené. Podmienky pre použitie monoklonálnych protilátok musí každé laboratórium overiť individuálne.
3. Presné a reprodukovateľné výsledky sa získajú len vtedy, ak sa použijú postupy v súlade s technickými údajmi v príbalovom letáku a v súlade s osvedčenou laboratórnou praxou.
4. Reagencia bola optimalizovaná tak, aby poskytovala čo najlepší pomer špecifického signálu k nešpecifickému. Z tohto dôvodu je dôležité v každom teste dodržiavať pomer medzi objemom reagencie a počtom leukocytov a erytrocytov.
5. V prípade nadbytku buniek naried'te vzorku PBS tak, aby koncentrácia bola menšia než 5×10^9 leukocytov/L a menšia než 6×10^{12} červených krviniek/L (6).
6. Pri niektorých chorobných stavoch, akými sú napríklad závažné zlyhanie obličiek alebo hemoglobínopatie, môže byť lýza červených krviniek pomalá, neúplná alebo dokonca nemožná. V takom prípade sa odporúča pred farbením izolovať mononukleárne bunky pomocou hustotného gradientu (napríklad Ficoll) (7).

Príklady a referencie nájdete v Dodatku.

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 USA a ďalších krajinách.

DOPLŇUJÚCE INFORMÁCIE

Pre pacienta/používateľa/tretiu stranu v Európskej únii a v krajinách s identickým regulačným režimom (Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro): ak sa počas používania tejto pomôcky alebo v dôsledku jej používania vyskytne vážna nehoda, nahláste ju výrobcovi a/alebo jeho autorizovanému zástupcovi a vášmu národnému orgánu.

HISTÓRIA REVÍZIÍ

REVÍZIA AF:	Dátum vydania: Január 2021
REVÍZIA AW:	
Aktualizácie kvôli súladu s dokumentom Beckman Coulter Global Labelling Policy (Globálne pravidlá označovania spoločnosti Beckman Coulter) a podľa požiadaviek nariadenia IVDR (EÚ) 2017/746:	
Pridané časti	Určený používateľ, Zhodnosť, Čistota a výťažnosť lymfocytov, Doplnujúce informácie, História revízií
Pridané informácie	Pozri časti Výstraha a opatrenia, Skladovanie a stabilita, Obmedzenia
Aktualizované časti	Výstraha a opatrenia, Klasifikácia nebezpečnosti podľa GHS, Skladovanie a stabilita, Znamky zhoršenia kvality, Postup, Charakteristika výrobku
Odstránené časti	Reprodukovateľnosť výsledkov v rámci laboratória

Popis symbolov

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

	시약 1	시약2
	고정제	투과성 시약
제형	액상	액상
활성 물질	포름알데히드	사포닌
용량	5 mL	5 mL
약병 수량	바이알 3개	바이알 3개
시험 당 용량	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 검사 150회, 6 x 5mL
검사당 2 x 0.1mL

체의 진단용

사용목적

IntraPrep은 바로 사용가능한 두 가지 시약으로 구성되며 단일클론 형광 항체를 통한 세포내 항원 결정기의 발현을 위해 백혈구 세포질 막에 투과성을 유도합니다. IntraPrep은 유세포분석기로 분석하기 위한 생물 검체를 준비할 때 사용됩니다. 이러한 종류의 분석에서 비특이 염색을 최소화할 수 있도록 최적화되었습니다(1,2,3,4).

원리

1단계로 세포를 시약 1로 고정합니다. 세척 후에 시약 2로 투과성을 유도하고 나머지 적혈구를 용해합니다. 이 단계에서 세포들이 세포내 항원 결정기에 한해 결합 단일 클론 항체와 접촉하게 됩니다. 유세포분석기로 백혈구를 분석합니다.

그렇다 하더라도 표면 항원 결정기 발현은 가능합니다. 이 경우 고정하기 전에 특이 결합 단일클론 항체를 배양합니다.

유세포 분석기는 세포의 빛 확산과 형광 영역을 측정합니다. 빛의 직교 확산(측면 산란, 즉 SS)와 좁은각의 광확산(전방 산란, 즉 FS)를 상관시킨 막대 그래프 상에서 정의된 전자적 창 내에서 관심이 가는 개체의 국부화를 가능하게 합니다. 유세포 분석기로 이용가능한 두 가지 서로 다른 파라메타들을 결합시킨 막대 그래프를 사용자가 선택한 애플리케이션에 따라 게이팅 단계에서 지원 자료로 사용 가능합니다.

범위가 결정된 세포의 형광 영역을 분석하여 명확하게 염색된 이벤트와 염색되지 않은 이벤트를 구분합니다. 분석 결과는 게이팅으로 획득한 전체 이벤트와 비교한 양성 이벤트의 비율로 표현합니다.

대상 사용자

본 제품은 실험실 전문가용입니다.

검체

정맥혈 검체나 골수 검체는 반드시 EDTA 염, ACD 또는 헤파린을 항응고제로 포함한 무균 튜브를 사용하여 채취합니다.

시료는 실온(18 - 25°C)에 보관해야 하며 흔들지 않아야 합니다. 실험용 시료를 채취하기 전에 시료를 살짝 흔들어서 균질화해야 합니다.

검체는 정맥천자 후 24시간 이내에 분석해야 합니다.

경고 및 주의 사항

1. 유효 기간이 지난 시약은 사용하지 마십시오.
2. 냉동하지 마십시오.
3. 빛 노출을 최소화하십시오.
4. 시약이 미생물에 오염되지 않도록 하십시오. 그러지 않으면 잘못된 결과를 얻을 수 있습니다.
5. 시약 1에는 포름알데히드가 함유됩니다. 포름알데히드는 독성이 있으며 알레르기를 유발합니다. 포름알데히드는 발암성 물질로 간주됩니다.
6. 시약 2아지드화 나트륨(NaN_3)을 포함합니다. 취급할 때 각별히 주의하십시오. 흡입을 피하고 피부, 점막 및 눈에 닿지 않도록 하십시오. 또한 산성 매질에 함유된 아지드화 나트륨은 잠재적 위험 물질인 히드라조산을 만들어낼 수 있습니다. 시약을 폐기할 때는 금속 파이프 내 아지드화 나트륨 축적과 폭발 위험을 방지하기 위해 다량의 물에 희석한 후 배수 시설로 흘려보내야 합니다.
7. 모든 혈액 검체는 잠재적으로 전염성이 있다고 간주하고 주의해서 다루어야 합니다(특히 보호용 장갑, 가운 및 보안경 착용).
8. 피펫을 절대 입으로 사용하지 않도록 하고 검체가 피부, 점막 및 눈에 닿지 않도록 하십시오.
9. 취급에 사용한 혈액 튜브 및 일회용 물질은 소각용 특수 용기에서 폐기해야 합니다.
10. 시약 및 폐기물은 현지 요구 사항에 따라 제거해야 합니다.

GHS 유해물질 등급

시약 1: 고정

위험



H302	삼킬 경우 해롭습니다.
H313	피부와 접촉하면 유해할 수 있음
H314	피부에 심한 화상 또는 눈에 손상을 일으킴.
H317	알레르기 피부 반응을 일으킬 수 있음.
H341	유전적인 결함을 일으킬 것으로 의심됨.
H350	암을 일으킬 수 있음.
H370	장기에 손상을 일으킴.
P201	사용 전 취급 설명서를 확보하십시오.
P280	보호용 장갑, 보호용 의류 및 눈/안면 보호장구를 착용하십시오.
P303+P361+P353	피부(또는 머리카락)에 묻은 경우: 피부를 물로 씻어내시오.
P305+P351+P338	눈에 들어간 경우: 수 분 동안 물로 조심스럽게 씻어내십시오. 콘택트렌즈가 있는 경우, 제거하기 쉽다면 제거하십시오. 계속해서 행구십시오.
P310	즉시 독성물질관리센터나 의사에게 연락하십시오. 메탄올 1 - 2 % 포름알데히드 5 - 10 %

SDS 안전보건자료는 techdocs.beckman.com에서 확인할 수 있습니다

보관 및 안정성

IntraPrep는 18~25°C에서 보관합니다.

닫힌 바이알의 안정성: 시약은 517일 동안 안정적입니다.

개봉한 바이알의 안정성: 시약은 90일 동안 안정적입니다.

www.beckman.com에서 로트별 분석증명서를 확인할 수 있습니다.

성능 저하 증거

시약 외관에 물리적 변화가 있는 경우 성능 저하를 나타내는 것일 수 있으므로 시약을 사용해서는 안 됩니다.

자세한 정보가 필요하거나 손상된 제품을 받은 경우에는 Beckman Coulter 고객 서비스에 800-742-2345(미국 또는 캐나다)로 또는 현지 Beckman Coulter 담당자에게 문의하십시오.

목차

소듐 아자이드 보존제는 금속 배수관에서 폭발성 화합물을 형성할 수 있습니다. NIOSH 게시판을 참조하십시오. Explosive Azide Hazard(폭발성 아지드 유해물질)(76/8/16)

아지드 화합물의 축적 가능성을 방지하려면 희석되지 않은 시약을 폐기한 다음 폐기 파이프를 물로 세척하십시오. 소듐 아자이드의 폐기는 해당 지역 규정을 따라야 합니다.

필요하지만 키트와 함께 제공되지 않는 품목:

- 검체 튜브와 검체 채취에 필요한 물질.
- 자동 피펫(10, 20, 50, 100 및 500 µL용 일회용 팁).
- 플라스틱 용혈 튜브.
- 특이 단일 클론 항체(mAb).
- 음성 정도관리 물질.
- 백혈구 고정 시약. 예: IOtest 3 고정액(참조 A07800).
- 완충액(PBS: 0.01M 인산나트륨, 0.145M 염화나트륨, pH 7.2).

- 원심분리기.
- 자동 교반기(교반 유형).
- 유세포 분석기.

절차

A - 세포질내 염색

검체에 존재하는 적혈구 수는 $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$)를 넘지 않아야 합니다. 필요할 경우 PBS로 희석합니다.

검체에 존재하는 백혈구 수는 $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$)를 넘지 않아야 합니다. 필요할 경우 PBS로 희석합니다.

검사 튜브 외에도 검사에 사용된 특정 염색법에 상응하는 음성 정도관리 물질과 세포가 혼합된 대조군 튜브를 분석된 검체 별로 하나씩 추가로 사용할 수 있습니다.

1. 50 μL 의 검사 검체를 각 튜브에 첨가합니다.
2. 각 튜브에 100 μL 의 시약 1을 첨가합니다. 시약을 첨가한 직후 튜브를 세게 흔들어 교반시킵니다.
3. 상온(18~25°C)에서 15분간 배양합니다.
4. 4mL의 PBS를 각 튜브에 첨가합니다.
5. 상온에서 최소 300 x g을 5분 간 원심분리합니다.
6. 흡입 시 상청액을 제거하십시오.
7. 각 튜브에 100 μL 의 시약 2를 첨가합니다. 교반하지 말고 시약 2가 자연스럽게 세포 펠릿으로 확산되도록 두십시오.
8. 상온(18~25°C)에서 5분간 흔들지 않고 배양합니다.
9. 2~3초간 가볍게 손으로 흔들어 줍니다.
10. 각 검사 튜브에 세포질내 항원결정기에 대한 특이성을 갖는 mAb를 필요한 양만큼 첨가하고, 필요한 경우 각 대조군 튜브에 적절한 양의 음성 정도관리 물질을 첨가합니다.
11. 튜브를 하나하나 가볍게 흔들어 섞어줍니다.
12. 실온(18~25°C)에서 빛을 피해 15분 동안 배양하십시오.
13. 4mL의 PBS를 각 튜브에 첨가합니다.
14. 상온에서 최소 300 x g을 5분 간 원심분리합니다.
15. 상청액을 흡입으로 제거하고 세포층을 0.5 또는 1 mL의 IOtest 3 고정액(REF. A07800)에 작업 농도(1X)로 하여 재현탁합니다. 따라서 고정된 검체는 2~8°C의 빛이 닿지 않는 곳에서 24시간 동안 보관 가능합니다.

B - 세포질내 및 막성 염색

검체에 존재하는 적혈구 수는 $6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($6 \times 10^{12}/\text{L}$)를 넘지 않아야 합니다. 필요할 경우 PBS로 희석합니다.

검체에 존재하는 적혈구 수는 $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$)를 넘지 않아야 합니다. 필요할 경우 PBS로 희석합니다.

검사 튜브 외에도 검사에 사용된 특정 염색법에 상응하는 음성 정도관리 물질과 세포가 혼합된 대조군 튜브를 분석된 검체 별로 하나씩 추가로 사용할 수 있습니다.

1. 50 μL 의 검사 검체를 각 튜브에 첨가합니다.
2. 각 검사 튜브에 막 항원결정기에 대한 특이성을 갖는 mAb를 필요한 양만큼 첨가하고, 필요한 경우 각 대조군 튜브에 적절한 양의 음성 정도관리 물질을 첨가합니다.
3. 튜브를 하나하나 가볍게 흔들어 섞어줍니다.
4. 실온(18~25°C)에서 빛을 피해 15분 동안 배양하십시오.
5. 각 튜브에 100 μL 의 시약 1을 첨가합니다. 시약을 첨가한 직후 튜브를 세게 흔들어 교반시킵니다.
6. 상온(18~25°C)에서 15분간 배양합니다.
7. 4mL의 PBS를 각 튜브에 첨가합니다.
8. 상온에서 최소 300 x g을 5분 간 원심분리합니다.
9. 흡입 시 상청액을 제거하십시오.
10. 각 튜브에 100 μL 의 시약 2를 첨가합니다. 교반하지 말고 시약 2가 자연스럽게 세포 펠릿으로 확산되도록 두십시오.
11. 상온(18~25°C)에서 5분간 흔들지 않고 배양합니다.
12. 2~3초간 가볍게 손으로 흔들어 줍니다.
13. 각 검사 튜브에 세포질내 항원결정기에 대한 특이성을 갖는 mAb를 필요한 양만큼 첨가하고, 필요한 경우 각 대조군 튜브에 적절한 양의 음성 정도관리 물질을 첨가합니다.
14. 각 제어 튜브에 20 μL 의 아이소타입 컨트롤을 첨가합니다.

15. 튜브를 하나하나 가볍게 흔들어 섞어줍니다.
16. 실온(18~25°C)에서 빛을 피해 15분 동안 배양하십시오.
17. 4mL의 PBS를 각 튜브에 첨가합니다.
18. 상온에서 최소 300 x g을 5분 간 원심분리합니다.
19. 상청액을 흡입으로 제거하고 세포층을 0.5 또는 1 mL의 IOTest 3 고정액(REF A07800)에 작업 농도(1X)로 하여 재현탁합니다. 따라서 고정된 검체는 2~8°C 사이의 빛이 닿지 않는 곳에서 24시간 보관 가능합니다.

성능

성능 데이터는 위에 설명한 절차를 이용하여 이전에 EDTA 염을 항응고제로 하여 무균 튜브에서 수집한 지 24시간 미만인 혈액 검체로 획득합니다. 분석은 면역염색 후 2시간 이내에 수행됩니다.

정밀도

양성 비율 값은 전혈과 골수를 사용하여 측정했습니다. 각 검체는 2개의 IntraPrep 투과화 시약 로트를 사용하여 2대의 장비에서 하루 동안 2회씩, 총 4회 실행되었습니다. 측정값(양성 비율)은 Navios 유세포 분석기로 도출했습니다. 분석은 CLSI 방법 EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods(EP5-A2: 정량적 측정 방법의 정밀도 성능 평가)를 기반으로 수행했습니다.

허용 기준은 각 집단에서 측정된 양성 이벤트 수에 따라 다릅니다.

- 양성 이벤트 수가 < 1,500인 경우 CV < 15 %
- 양성 이벤트 수가 > 1,500인 경우 CV < 10 %

전혈 EDTA:

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 순도							
양성 이벤트 수(평균) = 8877							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	2.29	1.82	6.47	2.25	1.65	5.82	7.09
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 회수율							
양성 이벤트 수(평균) = 8877							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	0.40	1.00	0.81	0.39	0.25	0.65	1.34
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

단핵구에 항글수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 1070							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.24	2.37	4.37	1.18	1.19	4.01	5.10
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

과립구에 항글수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 13246							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	0.09	0.03	0.16	0.04	0.03	0.12	0.16
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

전혈 헤파린:

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 순도							
양성 이벤트 수(평균) = 6824							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.33	1.17	2.74	1.65	1.66	1.73	3.40
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 회수율							
양성 이벤트 수(평균) = 6824							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	2.92	2.40	3.01	0.55	0.64	0.34	3.89
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

단핵구에 항글수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 961							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	2.02	0.96	5.17	2.32	3.74	2.94	5.74
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

과립구에 항골수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 20742							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.09	1.10	2.46	1.03	1.08	1.92	2.89
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

전혈 ACD:

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 순도							
양성 이벤트 수(평균) = 12355							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.91	1.60	3.54	1.55	1.35	2.65	4.18
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 회수율							
양성 이벤트 수(평균) = 12355							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	0.33	0.35	1.06	0.31	0.33	0.95	1.16
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

단핵구에 항골수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 1483							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.52	1.27	4.80	1.18	1.51	4.30	5.11
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

과립구에 항골수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 32715							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	0.97	0.85	2.83	0.88	0.79	2.54	3.08
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

골수 EDTA:

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 순도							
양성 이벤트 수(평균) = 8808							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.16	0.89	2.98	0.72	2.32	1.46	3.19
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 막 염색 = 림프구 회수율							
양성 이벤트 수(평균) = 8808							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	0.37	0.61	1.34	0.31	0.90	0.92	1.50
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

단핵구에 항골수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 2212							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	1.97	1.00	4.11	1.00	1.06	3.44	4.34
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

과립구에 항골수세포형과산화효소-FITC 세포질 내 염색 처리							
양성 이벤트 수(평균) = 33181							
	작업자 간	유세포 분석기 간	로트 내	로트 간	실행 간	실행 내	총계
CV(%)	0.11	0.29	0.37	0.10	0.13	0.33	0.48
결과	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

림프구 순도 및 회수율

림프구 순도 및 회수율은 CDC의 권고안에 따라 측정했습니다(5). 10명의 건강한 공여자에서 EDTA, 헤파린 및 ACD를 사용해 채취된 혈액과 5개의 골수를 단일 클론 항체 CD45-FITC 및 CD14-PE 혼합물로 표지했습니다. 회수율 및 순도의 평균 값과 범위는 다음 표에 제시되어 있습니다.

전혈 EDTA		
파라메타	회수율	순도
평균	93.6	89.7
최소/최대	86.1 / 97.6	83.5 / 95.5

전혈 헤파린		
파라메타	회수율	순도
평균	94.3	87.6
최소/최대	84.9 / 97.7	81.5 / 94.3

전혈 ACD		
파라메타	회수율	순도
평균	94.2	94.6
최소/최대	91.1 / 98.5	87.6 / 97.7

골수 EDTA		
파라메타	회수율	순도
평균	80.7	71.8
최소/최대	78.3 / 85.8	60.1 / 83.4

한계

1. 유세포 분석기가 완벽하게 정렬되지 않은 경우, 형광 누출이 올바르게 보정되지 않은 경우 또는 영역 위치를 신중하게 지정하지 않은 경우 유세포 분석법에서 잘못된 결과가 나올 수 있습니다.
2. 특정 항원 결정기는 포름알데히드나 사포닌에 민감하게 반응할 수 있습니다. 각 실험실은 반드시 단일클론 항체 사용 조건을 확인해야 합니다.
3. 사용한 절차가 동봉된 기술 책자의 내용을 따르고 실험실 모범 사례와 호환되는 경우 정확하고 재현 가능한 결과를 얻을 수 있습니다.
4. 본 시약은 최상의 특이/비특이 신호비를 제공하도록 최적화되었습니다. 그러므로 모든 테스트에서 시약의 용적/백혈구 및 적혈구 수의 비율을 준수해 주십시오.
5. 하이퍼루코사이토시스의 경우에는 표본을 PBS에 희석하여 5×10^9 백혈구/L 이하, 6×10^{12} 적혈구/L 이하 값을 얻어야 합니다 (6).
6. 심한 신부전 또는 혈액소병증 같은 특정 질병 상태에서 적혈구의 용해는 느리거나 불완전하거나 심지어는 불가능할 수도 있습니다. 이러한 경우 염색 전에 밀도 구배(예: Ficoll)를 사용하여 단핵구 세포를 분리하는 것이 좋습니다(7).

예시와 참고 자료는 부록을 참조하십시오.

상표

본 문서에 포함된 Beckman Coulter, 스타일 로고, Beckman Coulter 제품 및 서비스 마크는 미국 및 기타 국가에서 Beckman Coulter, Inc.의 상표이거나 등록 상표입니다.

추가 정보

유럽 연합 및 이와 동일한 규정 체제(EU 규정 2017/746, 체외 진단용 의료 기기 관련)를 사용하는 국가에 거주하는 환자/사용자/타사의 경우, 이 장치의 사용 중이나 사용으로 인해 심각한 상황이 발생했다면 제조업체 및/또는 공인 담당자와 해당 국가의 담당 기관에 신고하십시오.

개정 이력

개정판 AF:	발행 날짜: 2021년 1월
개정판 AW:	
Beckman Coulter 글로벌 라벨 지정 정책 및 IVD-R (EU) 2017/746 요건에 따라 업데이트했습니다.	
추가된 섹션	대상 사용자, 정밀도, 림프구 회수율 및 순도, 추가 정보, 개정 이력
추가된 정보	경고 및 주의 사항, 보관 및 안정성, 한계 섹션 참조
업데이트된 섹션	경고 및 주의 사항, GHS 유해물질 등급, 보관 및 안정성, 성능 저하 증거, 절차, 성능
삭제된 섹션	실험실간 재현성

기호 목록

기호 용어집은 beckman.com/techdocs에서 확인할 수 있습니다(문서 번호 B60062)

	Reaktif 1	Reaktif 2
	Sabitlenme maddesi	Permeabilite maddesi
Formülasyon	Likid	Likid
Etkin Madde	Formaldehid	Saponin
Hacim	5 mL	5 mL
Flakon sayısı	3 flakon	3 flakon
Test başına Hacim	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 test; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / test

In Vitro Diagnostik Kullanım içindir

KULLANIM AMACI

IntraPrep kullanıma hazır iki reaktiften oluşup, bunlar monoklonal floresan antikorlar aracılığıyla hücre içi antijenik belirleyicilerin gösterilmesi için lökositlerin sitoplazmik membranında permeabiliteye neden olur. IntraPrep akım sitometrisi ile analiz edilmesi için biyolojik örneklerin hazırlanmasında kullanılır. Bu tipte analizde spesifik olmayan boyamanın en aza indirilmesi için en uygun hale getirilmiştir (1,2,3,4).

İLKE

İlk adım olarak hücreler reaktif 1 ile tespit edilir. Yıkamadan sonra, reaktif 2 permeabiliteye neden olur ve kalan eritrositler parçalanır. Bu aşama sırasında, hücreler hücre içi antijenik belirleyicilere spesifik konjuge monoklonal antikorlar ile temas haline gelir. Lökositler daha sonra akım sitometrisi ile analiz edilir.

Bununla birlikte yüzey antijenik belirleyicilerin gösterilmesi mümkün kalır. Bu durumda, spesifik konjuge monoklonal antikorlar sabitleme işleminden önce inkübe edilir.

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

Sınırlı hücrelerin floresanı analiz edilerek pozitif boyalı olaylar boyasızlardan ayrılır. Sonuçlar pozitif olayların geçiş ile edinilmiş tüm olaylara yüzdesi olarak ifade edilir.

HEDEF KULLANICI

Bu ürün, laboratuvarında profesyonel kullanım için tasarlanmıştır.

ÖRNEKLER

Venöz kan veya kemik iliği örnekleri antikoagülan olarak EDTA tuzu, ACD veya heparin içeren steril tüpler kullanılarak alınmalıdır.

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

Örnekler venipunktür sonrası 24 saat içinde analiz edilmelidir.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Reaktif son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
2. Dondurmayın.
3. Işığa maruz kalmasını en aza indirin.
4. Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonundan kaçınmın yoksa yanlış sonuçlar oluşabilir.
5. Reaktif 1 formaldehit içerir. Formaldehit zehirlidir ve alerjendir. Kanserojen bir madde olduğu düşünülmektedir.
6. Reaktif 2 Sodyum asit (NaN₃) içerir. Dikkatle kullanılmalıdır. Yutmamın ve deri, mukoza ve gözlerle herhangi şekilde temasından kaçınmın. 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 örnekleri potansiyel olarak bulaşıcı olarak kabul edilmeli ve dikkatle ele alınmalıdır (özellikle koruyucu eldiven, önlük ve gözlük takılmalıdır).
8. Asla ağızla pipetleme yapmayın ve örneklerin cilt, mukoza veya gözle herhangi bir şekilde temas etmesini önleyin.

9. Taşıma için kullanılan kan tüpleri ve tek kullanımlık malzeme, yakma amacıyla özel kaplara atılmalıdır.

10. Reaktifler ve atıklar yerel gereksinimlere göre elimine edilmelidir.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Reaktif 1: Tespit

TEHLİKE



H302

Yutulması halinde zararlıdır.

H313

Cilt ile teması halinde zararlı olabilir.

H314

Ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına yol açar.

H317

Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.

H341

Genetik hasara yol açma şüphesi var.

H350

Kansere yol açabilir.

H370

Organlarda hasara yol açar.

P201

Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.

P280

Koruyucu eldiven, koruyucu kıyafet ve göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P303+P361+P353

CİLDİN (VEYA SAÇIN) ÜZERİNDE OLMASI HALİNDE: Cildinizi su ile durulayın.

P305+P351+P338

GÖZ İLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Takılı ve yapması kolaysa, kontak lensleri çıkartın. Durulamaya devam edin.

P310

Hemen ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru/hekimi arayın.

Metanol 1 - %2

Formaldehid 5 - %10



Güvenlik Veri Sayfası beckman.com/techdocs adresinde bulunabilir

SAKLAMA VE STABİLİTE

IntraPrep 18 ila 25°C arasında saklanır.

Kapalı flakonun stabilitesi: reaktif 517 gün stabildir.

Açılan şişenin stabilitesi: reaktif 90 gün stabildir.

Lota özel Analiz Sertifikası için www.beckman.com adresine bakın.

BOZULMA GÖSTERGESİ

Reaktiflerin fiziksel görünümündeki herhangi bir değişiklik bozulmayı gösterebilir ve reaktif kullanılmamalıdır.

Ek bilgi almak isterseniz veya aldığınız ürün hasarlı çıktıysa, 800-742-2345 numaralı telefondan (ABD veya Kanada) Beckman Coulter Müşteri Hizmetlerini arayın veya yerel Beckman Coulter Temsilcinizle temas kurun.

İÇİNDEKİLER

Sodyum azid koruyucu maddesi metal kanalizasyon hatlarında patlayıcı bileşimler oluşturabilir. NIOSH Bültenine bakın: Explosive Azide Hazard (Patlayıcı Azide Tehlikesi) (16.8.76).

Azid bileşenlerinin olası birikimini engellemek amacıyla, seyreltilmemiş reaktif çöpe atıldıktan sonra atık borularını bol suyla yıkayın. Sodyum azid, uygun yerel düzenlemelere göre çöpe atılmalıdır.

GEREKLİ OLAN ANCAK KİT İLE BİRLİKTE VERİLMİYEN MALZEMELER:

- Numune alma tüpleri ve numune alma için gerekli malzemeler.
- 10, 20, 50, 100 ve 500 µL'lik tek kullanımlık uçları olan otomatik pipetler.
- Plastik hemoliz tüpleri.
- Spesifik monoklonal antikorlar (mAb).

- Negatif kontroller.
- Lökosit fiksasyon reaktifi. Örneğin: IOTest 3 Fiksasyon Solüsyonu (Ref. A07800).
- Tampon (PBS: 0,01 M sodyum fosfat; 0,145 M sodyum klorür; pH 7,2).
- Santrifüjleyin.
- Otomatik karıştırıcı (Vorteks tipi).
- Akış sitometresi.

PROSEDÜR

A - Sitoplazma içinde boyama

Numune içindeki kırmızı kan hücre sayısı μL 'de 6×10^6 'den ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) az olmalıdır. Gerekirse PBS içinde seyreltin.

Numune içindeki lökosit sayısı $5 \times 10^9/\mu\text{L}$ 'den ($5 \times 10^9/\text{L}$) az olmalıdır. Gerekirse PBS içinde seyreltin.

Analiz edilen her örnek için, test tüpüne ek olarak, tercih edilen spesifik boyamaya karşılık gelen negatif kontrol varlığında hücrelerin karıştırıldığı bir kontrol tüpü eklenebilir.

1. Her bir tüpe 50 μL test örneği ekleyin.
2. Her tüpe 100 μL reaktif 1 ekleyin. Her eklemenin hemen ardından güçlü bir şekilde vorteksleyin.
3. Oda sıcaklığında (18 – 25°C) 15 dakika boyunca inkübe edin.
4. Her tüpe 4 mL PBS ekleyin.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüjleyin.
6. Aspirasyon ile üst fazı alın.
7. Her bir tüpe 100 μL reaktif 2 ekleyin. VORTEKSLEMEYİN, doğal olarak yayılması için reaktif 2'yi hücre peletine bırakın.
8. ÇALKALAMADAN oda sıcaklığında (18 – 25°C) 5 dakika boyunca inkübe edin.
9. 2 – 3 saniye boyunca elle yavaşça çalkalayın.
10. Her test tüpüne gerekli miktarda mAb (intrasitoplazmik antijenik belirleyici için spesifik) ekleyin ve gerekirse her kontrol tüpüne uygun miktarda negatif kontrol ekleyin.
11. Tüpleri sırasıyla yavaşça vorteksleyin.
12. Oda sıcaklığında (18-25°C) ışıktan koruyarak 15 dakika boyunca inkübe edin.
13. Her tüpe 4 mL PBS ekleyin.
14. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüjleyin.
15. Süpernatantı aspirasyonla alın ve hücre pelletini 0,5 veya 1 mL IOTest 3 Sabitleme Çözeltisi (Ref. A07800) içinde kendi çalışma konsantrasyonunda (1X) tekrar süspansiyon haline getirin. Böylece sabitlenen preparatlar 2 ila 8°C arasında ışıktan korunarak 24 saatte kadar saklanabilir.

B - Sitoplazma içinde ve membranda boyama

Numune içindeki kırmızı kan hücre sayısı μL 'de 6×10^6 'den ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) az olmalıdır. Gerekirse PBS ile seyreltin.

Numune içindeki lökosit sayısı $5 \times 10^9/\mu\text{L}$ 'den ($5 \times 10^9/\text{L}$) az olmalıdır. Gerekirse PBS ile seyreltin.

Analiz edilen her örnek için, test tüpüne ek olarak, tercih edilen spesifik boyamaya karşılık gelen negatif kontrol varlığında hücrelerin karıştırıldığı bir kontrol tüpü eklenebilir.

1. Her bir tüpe 50 μL test örneği ekleyin.
2. Her test tüpüne gerekli miktarda mAb (membranöz antijenik determinant için özel) ekleyin ve gerekirse her kontrol tüpüne uygun miktarda negatif kontrol ekleyin.
3. Tüpleri sırasıyla yavaşça vorteksleyin.
4. Oda sıcaklığında (18-25°C) ışıktan koruyarak 15 dakika boyunca inkübe edin.
5. Her tüpe 100 μL reaktif 1 ekleyin. Her eklemenin hemen ardından güçlü bir şekilde vorteksleyin.
6. Oda sıcaklığında (18 – 25°C) 15 dakika boyunca inkübe edin.
7. Her tüpe 4 mL PBS ekleyin.
8. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüjleyin.
9. Aspirasyon ile üst fazı alın.
10. Her bir tüpe 100 μL reaktif 2 ekleyin. VORTEKSLEMEYİN, doğal olarak yayılması için reaktif 2'yi hücre peletine bırakın.
11. ÇALKALAMADAN oda sıcaklığında (18 – 25°C) 5 dakika boyunca inkübe edin.

12. 2 – 3 saniye boyunca elle yavaşça çalkalayın.
13. Her test tüpüne gerekli miktarda mAb (intrasitoplazmik antijenik belirleyici için spesifik) ekleyin ve gerekirse her kontrol tüpüne uygun miktarda negatif kontrol ekleyin.
14. Her bir kontrol tüpüne 20 µL izotipik kontrol ekleyin.
15. Tüpleri sırasıyla yavaşça vorteksleyin.
16. Oda sıcaklığında (18-25°C) ışıktan koruyarak 15 dakika boyunca inkübe edin.
17. Her tüpe 4 mL PBS ekleyin.
18. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüjleyin.
19. Süpernatantı aspirasyonla alın ve hücre pelletini 0,5 veya 1 mL IOTest 3 Sabitleme Çözeltisi (Ref. A07800) içinde kendi çalışma konsantrasyonunda (1X) tekrar süspansiyon haline getirin. Böylece sabitlenen preparatlar 2 ila 8°C arasında ışıktan korunarak 24 saatte kadar saklanabilir.

PERFORMANS

Performans verileri, antikoagülan olarak EDTA tuzu içeren steril tüplerde daha önce toplanan, 24 saatten eski olmayan kan örnekleri üzerinde yukarıdaki prosedür kullanılarak elde edilmiştir. İmmün boyamayı takiben 2 saat içinde analiz gerçekleştirilir.

KESİNLİK

Yüzde pozitif değerleri, Tam Kan ve Kemik İliği kullanılarak belirlenmiştir. Her örnek, 2 lot IntraPrep Permeabilizasyon Reaktif kullanılarak 2 cihazda 1 gün boyunca günde iki kez olmak üzere 4 kez çalışılmıştır. Ölçümler (% pozitif) Navios akış sitometresi üzerinde yapılmıştır. Analiz, CLSI yöntemi EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kantitatif Ölçüm Yöntemlerinin Kesinlik Performansına İlişkin Değerlendirme) temelinde yürütülmüştür.

Kabul kriterlerimiz, her popülasyon için ölçülen pozitif olay sayısına bağlıdır:

- Pozitif olay <1.500, VK <%15 ise
- Pozitif olay >1.500, VK <%10 ise

Tam Kan EDTA:

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Saflık							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 8877							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Geri Kazanım							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 8877							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 1070							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granülositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 13246							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tam Kan HEPARİN:

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Saflık							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 6824							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Geri Kazanım							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 6824							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 961							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granülositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 20742							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tam Kan ACD:

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Saflık							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 12355							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Geri Kazanım							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 12355							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 1483							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granülositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 32715							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Kemik İliği EDTA:

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Saflık							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 8808							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranöz boyama=Lenfositik Geri Kazanım							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 8808							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Monositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 2212							

	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Granülositler üzerinde Anti-Miyeloperoksidaz-FITC intrasitoplazmik boyama							
Pozitif olay sayısı (Ortalama)= 33181							
	Kullanıcılar arası	Sitometreler arası	Lot içi	Lotlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi	Total
VK (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
SONUÇLAR	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LENFOSİTİK SAFLIK VE GERİ KAZANIM

Lenfositik saflık ve geri kazanım, CDC'nin önerilerine göre değerlendirilmiştir (5). EDTA, Heparin ve ACD'de örneklenen 10 sağlıklı donörün kanı ve 5 kemik iliği, monoklonal antikolar CD45-FITC ve CD14-PE karışımı ile etiketlenmiştir. Geri kazanım ve saflığın ortalama değerleriyle birlikte aralık aşağıdaki tablolarda verilmiştir:

Tam Kan EDTA		
Parametre	Geri kazanım	Saflık
Ortalama	93,6	89,7
Min/Maks	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Tam Kan HEPARİN		
Parametre	Geri kazanım	Saflık
Ortalama	94,3	87,6
Min/Maks	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Tam Kan ACD		
Parametre	Geri kazanım	Saflık
Ortalama	94,2	94,6
Min/Maks	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Kemik İliği EDTA		
Parametre	Geri kazanım	Saflık
Ortalama	80,7	71,8
Min/Maks	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

SINIRLAMALAR

1. Akış sitometrisi, sitometre mükemmel şekilde hizalanmadıysa, floresan sızıntıları doğru şekilde telafi edilmediyse ve bölgeler dikkatli bir şekilde konumlandırılmadıysa yanlış sonuçlar üretebilir.
2. Bazı antijenik belirleyiciler formaldehit veya saponine karşı duyarlı olabilir. Her laboratuvar monoklonal antikoların kullanımı açısından koşulları onaylamalıdır.
3. Kullanılan prosedürler teknik bilgi broşürüne uygun olduğu ve iyi laboratuvar uygulamalarına uygun olduğu sürece doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecektir.
4. Bu reaktif en iyi spesifik sinyal/spesifik olmayan sinyal oranını sunacak şekilde uygun hale getirilmiştir. Bu nedenle, her testte reaktif hacmi/lökosit ve eritrosit hacmi oranına bağlı kalınması önemlidir.
5. Hipersellülerite durumunda, 5×10^9 lökosit/L'nin azını ve 6×10^{12} kırmızı kan hücresi/L'nin azını elde etmek için örneği PBS'de seyreltin (6).
6. Şiddetli böbrek yetmezliği veya hemoglobinopatiler gibi bazı hastalık durumlarında, eritrosit lizisi yavaş, eksik ve hatta imkansız olabilir. Bu durumda mononükleotidli hücrelerin boyama öncesinde yoğunluk gradyanı (örneğin Ficoll) kullanılarak izole edilmesi önerilmektedir (7).

Örnekler ve referanslar için Ek'e 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.

EK BİLGİLER

Avrupa Birliği'nde ve aynı düzenleme rejiminin olduğu ülkelerdeki (In Vitro Diagnostik Tıbbi Cihazlar hakkında 2017/746/EU sayılı Yönetmelik) hasta/kullanıcı/üçüncü taraflar için; bu cihazın kullanımı sırasında veya cihazın kullanımının bir sonucu olarak ciddi bir olay meydana gelirse lütfen olayı üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal yetkili makamınıza bildirin.

REVİZYON GEÇMİŞİ

REVİZYON AF:	Yayın tarihi: Ocak 2021
REVİZYON AW:	
Beckman Coulter Global Etiketleme Politikasıyla uyumluluk sağlamak için ve IVD-R (AB)2017/746 gerekliliklerine göre güncellemeler yapıldı:	
Bölümler eklendi	Hedef Kullanıcı, Kesinlik, Lenfositik Geri Kazanım ve Safılık, Ek Bilgiler, Revizyon Geçmiş
Bilgi eklendi	Uyarılar ve Önlemler, Saklama ve Stabilitate, Sınırlamalar bölümlerine bakın
Güncellenmiş bölümler	Uyarılar ve Önlemler, GHS Tehlike Sınıflandırması, Saklama ve Stabilitate, Bozulma Göstergesi, Prosedür, Performans
Bölümler kaldırıldı	Laboratuvar İçi Tekrar Üretilbilirlik

Sembol Anahtarı

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

	Реагент 1	Реагент 2
	Фиксирующее вещество	Пермеабилзирующее вещество
Форма выпуска	Жидкость	Жидкость
Активный ингредиент	Формальдегид	Сапонин
Объем	5 мл	5 мл
Число флаконов	3 флакона	3 флакона
Объем на одно определение	100 мкл	100 мкл

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 определений; 6 x 5 мл
2 x 0,1 мл / определение

Применяется для *In Vitro* диагностики.

НАЗНАЧЕНИЕ

IntraPrep состоит из двух готовых к употреблению реактивов, которые увеличивают проницаемость плазматической мембраны лейкоцитов, что позволяет определять внутриклеточные антигенные детерминанты с помощью флуоресцирующих моноклональных антител. IntraPrep используют для приготовления биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии. Реактив оптимизирован для минимизации неспецифического окрашивания при исследовании данного типа (1,2,3,4).

ПРИНЦИП РАБОТЫ

На первом этапе клетки фиксируют реактивом 1. После отмывания лейкоциты пермеабилзируют реактивом 2; при этом происходит лизис эритроцитов. На следующем этапе клетки подвергают воздействию конъюгированных моноклональных антител, специфичных к внутриклеточным антигенным детерминантам. Затем лейкоциты анализируют методами проточной цитометрии.

Тем не менее, возможность визуализации поверхностных антигенных детерминант сохраняется. В этом случае конъюгаты специфических моноклональных антител инкубируют с клетками до фиксации.

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.

Флуоресценцию разграниченных клеток анализируют с целью различения положительно-окрашенных и неокрашенных событий. Результаты выражаются в виде процентного отношения положительных событий ко всем событиям, полученным в ходе селекции.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

Изделие предназначено для использования в лаборатории персоналом с профессиональной подготовкой.

ПРОБЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга собирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (соль EDTA или цитрат-декстрозу, или гепарин).

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.

Пробы требуется проанализировать в течение 24 ч после венипункции.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не используйте реагенты после истечения срока годности.
2. Не замораживать.
3. Минимизируют воздействие света.
4. Во избежание получения ошибочных результатов не допускайте микробной контаминации реагентов.
5. Реагент 1 содержит формальдегид. Формальдегид является токсичным и аллергенным. Он считается канцерогенным агентом.

6. Реактив 2 содержит азид натрия (NaN_3). Он требует осторожного обращения. Не принимайте внутрь и избегайте попадания на кожу, слизистые оболочки и глаза. Кроме того, в кислой среде из азидов натрия может образоваться потенциально опасное соединение азотистоводородная кислота. Во избежание накопления взрывоопасных производных азидов натрия на поверхности металлических труб рекомендуется перед удалением реактива в отходы развести его большим объемом воды, а затем слить в сток.
7. Все пробы крови должны считаться потенциально инфицированными, при обращении с ними необходимо соблюдать осторожность (в частности, использовать защитные перчатки, одежду и очки).
8. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте любого контакта проб с кожей, слизистыми и глазами.
9. При утилизации пробирок и одноразовых материалов следует использовать специальные предназначенные для сжигания контейнеры.
10. При утилизации реагентов и отходов необходимо следовать требованиям местного законодательства.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Реагент 1: Фиксация

ОПАСНО!



H302	Оказывает вредное воздействие при проглатывании.
H313	Может нанести вред при контакте с кожей
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
H341	Предположительно вызывает генетические дефекты.
H350	Может вызвать рак.
H370	Наносит вред органам.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. Метанол 1 - 2% Формальдегид 5 - 10%



Паспорт безопасности доступен на сайте beckman.com/techdocs

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

IntraPrep следует хранить при 18 – 25°C.

Стабильность в закрытом флаконе: реагент сохраняет стабильность в течение 517 дн.

Стабильность в открытом флаконе: реагент сохраняет стабильность в течение 90 дн.

См. специфический для партии сертификат анализа на веб-сайте www.beckman.com.

ПРИЗНАКИ ПОРЧИ

Любые изменения внешнего вида реагентов могут говорить о порче, использовать такой реагент не следует.

За дополнительной информацией или при получении поврежденной продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-742-2345 (в США или Канаде) или свяжитесь со своим местным представителем Beckman Coulter.

СОДЕРЖАНИЕ

Консервант с содержанием азидов натрия может образовывать взрывоопасные соединения в металлической водопроводной арматуре. См. бюллетень Национального института по охране труда и промышленной гигиене (NIOSH): Explosive Azide Hazard (Взрывоопасные азиды) (16.8.76).

Чтобы избежать накопления азидных соединений, промывайте сливные трубы водой после сброса неразбавленного реагента. Утилизацию азидов натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В НАБОР:

- Необходимые для взятия проб пробирки и материалы.
- Автоматические пипетки и одноразовые наконечники вместимостью 10, 20, 50, 100 и 500 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Специфические моноклональные антитела (mAb).
- Отрицательные контроли.
- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (фиксирующий раствор) (ссылочный номер A07800).
- Буфер (PBS: 0,01 М натрия фосфата; 0,145 М натрия хлорида; pH 7,2).
- Центрифугируйте.
- Автоматическая мешалка (вортексная)
- Проточный цитометр.

ПРОЦЕДУРА

А - Внутрицитоплазматическое окрашивание

Число эритроцитов в образце не должно превышать 6×10^6 /мкл (6×10^{12} /л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать 5×10^3 /мкл (5×10^9 /л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждой анализируемой пробы в дополнение к тестовой пробирке можно добавить одну контрольную пробирку, в которой клетки смешаны в присутствии отрицательного контроля, соответствующего выбранному специфическому окрашиванию.

1. Добавьте 50 мкл испытуемого образца в каждую пробирку.
2. Добавьте 100 мкл реагента 1 в каждую пробирку. Энергично перемешайте на вортексе сразу же после каждого добавления.
3. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
4. Добавляют 4 мл PBS в каждую пробирку.
5. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
6. Удаляют надосадочную жидкость путем аспирации.
7. Добавьте 100 мкл реагента 2 в каждую пробирку. НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ВОРТЕКС, дайте реагенту 2 естественным образом диффундировать в осадок клеток.
8. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре (18 – 25°C), НЕ ВСТРЯХИВАЯ.
9. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
10. Добавьте необходимое количество mAb (специфического для внутрицитоплазматической антигенной детерминанты) в каждую тестовую пробирку, и если требуется, добавьте соответствующее количество отрицательного контроля в каждую контрольную пробирку.
11. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
12. Инкубируют при комнатной температуре (18–25°C) в течение 15 мин, в защищенном от света месте.
13. Добавляют 4 мл PBS в каждую пробирку.
14. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
15. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов.

Б - Окрашивание внутрицитоплазматических и мембранных детерминант

Число эритроцитов в образце не должно превышать 6×10^6 /мкл (6×10^{12} /л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Число лейкоцитов в образце не должно превышать 5×10^3 /мкл (5×10^9 /л). При необходимости образец разводят ФСБ.

Для каждой анализируемой пробы в дополнение к тестовой пробирке можно добавить одну контрольную пробирку, в которой клетки смешаны в присутствии отрицательного контроля, соответствующего выбранному специфическому окрашиванию.

1. Добавьте 50 мкл испытуемого образца в каждую пробирку.
2. Добавьте необходимое количество mAb (специфического для мембранной антигенной детерминанты) в каждую тестовую пробирку, и если требуется, добавьте соответствующее количество отрицательного контроля в каждую контрольную пробирку.
3. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
4. Инкубируют при комнатной температуре (18–25°C) в течение 15 мин, в защищенном от света месте.
5. Добавьте 100 мкл реагента 1 в каждую пробирку. Энергично перемешайте на вортексе сразу же после каждого добавления.
6. Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (18 – 25°C).
7. Добавляют 4 мл PBS в каждую пробирку.
8. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
9. Удаляют надосадочную жидкость путем аспирации.
10. Добавьте 100 мкл реагента 2 в каждую пробирку. НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ВОРТЕКС, дайте реагенту 2 естественным образом диффундировать в осадок клеток.
11. Инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре (18 – 25°C), НЕ ВСТРЯХИВАЯ.
12. Медленно покачивают пробирки руками в течение 2 – 3 секунд.
13. Добавьте необходимое количество mAb (специфического для внутрицитоплазматической антигенной детерминанты) в каждую тестовую пробирку, и если требуется, добавьте соответствующее количество отрицательного контроля в каждую контрольную пробирку.
14. В каждую контрольную пробирку вносят по 20 мкл изотипического контроля.
15. Осторожно встряхивают пробирки по очереди на приборе Vortex.
16. Инкубируют при комнатной температуре (18–25°C) в течение 15 мин, в защищенном от света месте.
17. Добавляют 4 мл PBS в каждую пробирку.
18. Центрифугируют в течение 5 минут при 300 x g при комнатной температуре.
19. Удаляют супернатант аспирацией и ресуспендируют осадок клеток в 0,5 или 1 мл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) в рабочем разведении (1X). Фиксированные таким образом препараты можно хранить в темноте при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Рабочие характеристики получены с использованием описанной выше процедуры на пробах, собранных не ранее чем за 24 часа до анализа в стерильные пробирки с солью ЭДТА как антикоагулянтом. Анализ проводится в течение 2 часов после иммуноокрашивания.

ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Процент положительных результатов был установлен с использованием цельной крови и костного мозга. Каждую пробу измеряли 4 раза, два раза в день в течение 1 дня на 2 приборах, с использованием 2 партий пермеабилizующего реагента IntraPrep. Измерения (% положительных) выполняли на проточном цитометре Navios. Анализ проводился на основе метода CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Оценка прецизионности количественных методик измерения).

Наши критерии принятия зависят от количества положительных событий, измеренных для каждой популяции:

- Если положительных событий <1 500, CV <15%
- Если положительных событий >1 500, CV <10%

Цельная кровь с ЭДТА:

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = чистота лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 8877							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого

CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = восстановление лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 8877							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на моноцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 1070							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на гранулоцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 13246							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Цельная кровь с ГЕПАРИНОМ:

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = чистота лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 6824							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = восстановление лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 6824							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на моноцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 961							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на гранулоцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 20742							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Цельная кровь с цитратом декстрозы (ACD):

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = чистота лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 12355							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = восстановление лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 12355							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого

CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на моноцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 1483							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на гранулоцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 32715							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Костный мозг с ЭДТА:

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = чистота лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 8808							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Мембранное окрашивание CD45/CD14 = восстановление лимфоцитов							
Количество положительных событий (среднее) = 8808							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на моноцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 2212							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Внутрицитоплазматическое окрашивание с использованием антитела к миелопероксидазе-FITC на гранулоцитах							
Количество положительных событий (среднее) = 33181							
	Между операторами	Между цитометрами	Внутри партии	Между партиями	Между анализами	Внутри анализа	Итого
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
РЕЗУЛЬТАТЫ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ЧИСТОТА И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ

Чистота и восстановление лимфоцитов оценивались в соответствии с рекомендациями CDC (5). Пробы крови 10 здоровых доноров в ЭДТА, гепарине и цитрате декстрозы (ACD) и 5 проб костного мозга были помечены смесью моноклональных антител CD45-FITC и CD14-PE. Средние значения восстановления и чистоты, а также диапазон, приводятся в следующих таблицах:

Цельная кровь с ЭДТА		
Параметр	Восстановление	Чистота
Среднее значение	93,6	89,7
Мин./Макс.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Цельная кровь с ГЕПАРИНОМ		
Параметр	Восстановление	Чистота
Среднее значение	94,3	87,6
Мин./Макс.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Цельная кровь с цитратом декстрозы (ACD)		
Параметр	Восстановление	Чистота
Среднее значение	94,2	94,6
Мин./Макс.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Костный мозг с ЭДТА		
Параметр	Восстановление	Чистота
Среднее значение	80,7	71,8
Мин./Макс.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При проведении проточной цитометрии возможно получение ложных результатов, если цитометр не был идеально позиционирован, не была проведена правильная компенсация утечек флуоресцентного агента или точное позиционирование областей.
2. Некоторые антигенные детерминанты могут быть чувствительны к формальдегиду или сапониу. Каждой лаборатории необходимо контролировать условия использования моноклональных антител.
3. Для получения точных и повторяемых результатов необходимо выполнять процедуры в соответствии с инструкцией-вкладышем и требованиями надлежащей лабораторной практики.
4. Данный реактив оптимизирован таким образом, чтобы обеспечить наилучшее отношение специфического сигнала к неспецифическому. Поэтому важно, чтобы соотношение объема реактива и числа лейкоцитов при каждом определении было одним и тем же.
5. В случае цитоза образец следует разводить ФСБ таким образом, чтобы концентрация лейкоцитов стала меньше $5 \times 10^9/\text{л}$, а концентрация эритроцитов меньше $6 \times 10^{12}/\text{л}$ (6).
6. При определенных заболеваниях, таких как острая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может протекать медленно, быть неполным или даже невозможным. В таком случае рекомендуется изолировать одноядерные клетки, используя градиент плотности (например, фиколл), перед окрашиванием (7).

Примеры и ссылки см. в Приложении.

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, Inc. в Соединенных Штатах и других странах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Для пациента / пользователя / третьей стороны в Европейском Союзе и в странах с идентичным регуляторным режимом (Регламент 2017/746/ЕС в отношении медицинских изделий для *in vitro* диагностики); если, во время использования этого изделия или в результате его использования произошел серьезный инцидент, сообщите о нем производителю и/или его уполномоченному представителю и своему национальному органу регулирования.

СВЕДЕНИЯ О ВЕРСИЯХ

ВЕРСИЯ AF:	Дата выпуска: январь 2021 г.
ВЕРСИЯ AW:	
Обновления с целью приведения в соответствие политике международной маркировки Beckman Coulter и для выполнения требований IVD-R (EC)2017/746:	
Добавлены разделы	«Предполагаемый пользователь», «Прецизионность», «Восстановление и чистота лимфоцитов», «Дополнительная информация», «Сведения о версиях»
Добавлена информация	См. разделы «Предупреждения и меры предосторожности», «Хранение и стабильность», «Ограничения»
Обновленные разделы	«Предупреждения и меры предосторожности», «Классификация опасностей по системе СГС», «Хранение и стабильность», «Признаки порчи», «Процедура», «Эксплуатационные характеристики»
Удалены разделы	внутрилабораторная воспроизводимость результатов

Определения символов

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

	Reagent 1	Reagent 2
	Kinnitusaine	Läbipaistvusaine
Moodustumine	Vedel	Vedel
Toimeaine	Formaldehüüd	Saponiin
Maht	1 viaali	1 viaali
Viaalide arv	3 viaali	3 viaali
Maht analüüsi kohta	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 analüüsi; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml/analüüs

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

KASUTUSOTSTARVE

IntraPrep koosneb kahest kasutamiseks valmis eagendist, mis muudab leukotsüütide tsütoplasma membraanid läbipaistvaks, et näidata helendavate monoklonaalsete antikehade abil rakusiseseid antigeenseid tegureid. IntraPrepi kasutatakse bioloogiliste proovide ettevalmistamiseks analüüsiks läbivoolu tsütomeetriaga. Seda on optimeeritud, et minimeerida mitespetsiifilist värvimist seda tüüpi analüüsides (1,2,3,4).

PÕHIMÕTE

Kõigepealt fikseeritakse rakud 1. reagentiga. Pärast pesemist saavutatakse 2. reagentiga läbipaistvus ja lüüsitakse allesjäänud erütrotsüüdid. Selles staadiumis viiakse rakud kokku pööratud monoklonaalsete antikehadega, mis on omased rakusisestele antigeensetele teguritele. Seejärel analüüsitakse leukotsüüte läbivoolu tsütomeetriaga.

Sellest hoolimata on võimalik antigeensete pinnategurite näitamine. Sellisel juhul inkubeeritakse omased pööratud monoklonaalsed antikehad enne kinnitamist.

Läbivoolu tsütomeeter mõõdab valguse hajumist ja rakkude fluorestsentsi. See muudab võimalikuks huvialuse populatsiooni asukoha määramise histogrammil määratud elektroonilisel alal. Histogramm korreleerib valguse ortogonaalset hajumist (külghajumine (Side Scatter) ehk SS) ja kitsasnurga valguse hajumist (otsehajumine (Forward Scatter) ehk FS). Teisi histograme, kus ühendatakse tsütomeetrias saadaolevat kahte parameetrit, võib kasutada lüüsimisetapis sõltuvalt kasutaja valitud rakendusest.

Piiritletud rakkude fluorestsentsi analüüsitakse, et eristada positiivselt värvitud sündmusi värvimata sündmustest. Tulemusi kajastatakse positiivsete sündmuste protsentuaalse osakaaluna kõigi värvdamisega hõivatud sündmuste suhtes.

SIHTKASUTAJA

See toode on ette nähtud laboratoorseks kasutamiseks.

PROOVID

Veenivere- või luuüdi-proovid tuleb võtta steriilsete katsutitega, mis sisaldavad antikoagulandina EDTA soola, ACD-d või hepariini.

Proove tuleb hoida toatemperatuuril (18–25 °C) ja neid ei tohi raputada. Proov tuleb ühtlustada seda enne näidisproovi võtmist õrnalt loksutades.

Proove tuleb analüüsida 24 tunni jooksul alates veenipunktsioonist.

HOIATUS JA ETTEVAATUSABINÕUD

1. Ärge kasutage reagenti pärast aegumiskuupäeva.
2. Ärge külmutage.
3. Minimeerige kokkupuudet valgusega.
4. Vältige reagentide mikroobidega saastumist, vastasel juhul võite saada valed tulemused.
5. Reagent 1 sisaldab formaldehüüdi. Formaldehüüd on toksiline ja allergeenne. Arvatavalt on see kantserogeenne.
6. Reagent 2 sisaldab Naatriumasiid (NaN₃). Seda tuleb käsitseda ettevaatlikult. See pole mõeldud seepidiseks kasutamiseks. Vältige kokkupuudet naha, limaskesta ja silmadega. Peale selle võib naatriumasiid happelises keskkonnas tekitada potentsiaalselt ohtlikku vesinikasiidhapet. Kui reagenti peab kasutusest kõrvaldama, on soovitatav seda nne äravoolu valamist suures hulgas vees lahjendada, et vältida naatriumasiidi kogunemist metalltorudes ja hoida ära plahvatusohtu.
7. Kõiki vereproove tuleb pidada potentsiaalselt nakkusohtlikuks ja käsitseda ettevaatusega (kasutage kaitsekindaid, kitlit ning kaitseprille).
8. Ärge kunagi pipettige suuga ja vältige proovide kokkupuudet naha, limaskesta ja silmadega.

9. Verekatsetid ja käitlemiseks kasutatav ühekordselt kasutatav materjal tuleb hävitada põletamiseks ettenähtud spetsiaalsetes konteinerites.

10. Reagendid ja jäätmed tuleb kõrvaldada vastavalt kohalikele nõuetele.

GHS-I OHUKLASSIFIKATSIOON

Reagent 1: fikseerimine ETTEVAATUST



H302	Allaneelamisel kahjulik.
H313	Nahale sattumisel võib olla kahjulik
H314	Põhjustab rasket nahasöövitust ja silmakahjustusi.
H317	Võib põhjustada allergilist nahareaktsiooni.
H341	Arvatavasti põhjustab geneetilisi defekte.
H350	Võib põhjustada vähktõbe.
H370	Kahjustab elundeid.
P201	Enne kasutamist tutvuda erijuhistega.
P280	Kanda kaitsekindaid, kaitserõivastust ja kaitseprille/kaitsemaski.
P303+P361+P353	NAHALE (või juustele) SATTUMISE KORRAL: loputada nahka veega.
P305+P351+P338	SILMA SATTUMISE KORRAL: loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldada kontaktläätsed, kui neid kasutatakse ja kui neid on kerge eemaldada. Loputada veel kord.
P310	võtta viivitamata ühendust MÜRGISTUSKESKUSE või arstiga. Metanool 1 - 2% Formaldehüüd 5 - 10%



Ohutuskaart on kättesaadav veebilehel beckman.com/techdocs

SÄILITAMINE JA STABIILSUS

IntraPrepi säilitatakse temperatuuril 18–25 °C.

Suletud viaali stabiilsus: reagent on stabiilne 517 päeva.

Avatud viaali stabiilsus: reagent on stabiilne 90 päeva.

Vt partiispetsiifilist analüüsi sertifikaati veebilehelt www.beckman.com.

RIKNEMISE TUNNUSED

Igasugune muutus reagentide füüsilises välimuses võib viidata reagendi riknemisele ja seda ei tohi kasutada.

Lisateabe hankimiseks või kahjustatud toote saamisel helistage Beckman Coulteri klienditeenindusse numbril 800-742-2345 (USA või Kanada) või võtke ühendust kohaliku Beckman Coulteri esindajaga.

SISU

Naatriumasiidist konservant võib moodustada metallist kanalisatsioonitorudes plahvatusohtlikke ühendeid. Vt asutuse NIOSH teadaannet. Explosive Azide Hazard (Plahvatusohtliku asiidi oht) (16.8.76).

Vältimaks võimalikku asiidiühendite akumulierimist, loputage äravoolorusid pärast lahjendamata reagendi kõrvaldamist. Naatriumasiidi kõrvaldamine peab olema kooskõlas asjakohaste kohalike eeskirjadega.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Proovide kogumiseks vajalikud proovivõtukatsutid ja vahendid.
- Ühekordselt kasutatavate otsadega 10, 20, 50, 100 ja 500 µl automaatpipetid.
- Plastist hemolüüsi katsutid.

- Spetsiifilised monoklonaalsed antikehad (mAb).
- Negatiivsed kontrollained.
- Leukotsüütide fikseerimisreagent. Näide Tootesarja IOTest 3 fikseerimisreagent (viitenr A07800).
- Puhver (PBS: 0,01 M naatriumfosfaat; 0,145 M naatriumkloriid; pH 7,2).
- Tsentrifuugige.
- Automaatsegisti (vibratsioonsegamise tüüpi).
- Voolutsütomeeter.

PROTSEDUUR

A - intratsütoplasmaatiline värvimine

Proovis tohib olla punaseid vereliblesid vähem kui 6×10^6 μl kohta ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Vajaduse korral lahjendage PBS-is.

Leukotsüütide arv proovis peab olema väiksem kui $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Vajaduse korral lahjendage PBS-is.

Iga analüüsitava proovi korral saab lisaks analüüsikatsutile lisada ühe kontrollkatsuti, kus rakud segatakse konkreetsele valitud värvimismeetodile vastava negatiivse kontrollainega.

1. Lisage igasse katsutisse 50 μl analüüsiproovi.
2. Lisage mõlemasse katsutisse 100 μl reagenti 1. Vibratsioonsegage tugevalt kohe pärast iga täiendust.
3. Inkubeerige 15 minutit toatemperatuuril (18–25 °C).
4. Lisage kumbagi katsutisse 4 ml PBS-i.
5. Tsentrifuugige toatemperatuuril 5 minutit 300 \times g juures.
6. Eemaldage aspiratsiooniga pealislahus.
7. Lisage igasse katsutisse 100 μl reagenti 2. ÄRGE VIBRATSIOONSEGAGE, laske reagendil 2 rakugraanulisse loomulikult difundeeruda.
8. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril (18–25 °C) RAPUTAMATA.
9. Raputage käsitsi aeglaselt 2 kuni 3 sekundit.
10. Lisage igasse analüüsikatsutisse vajalik kogus mAb-d (spetsiifiline intratsütoplasmaatilise antigeeni määravale ainele) ja vajaduse korral lisage igasse kontrollkatsutisse sobiv kogus negatiivset kontrollainet.
11. Keerutage ettevaatlikult iga katsutit.
12. Inkubeerige valguse eest kaitstult 15 minutit toatemperatuuril (18–25 °C).
13. Lisage kumbagi katsutisse 4 ml PBS-i.
14. Tsentrifuugige toatemperatuuril 5 minutit 300 \times g juures.
15. Eemaldage aspireerimisega ülemine vedelikukiht ja suspendeerige uuesti verelibledes graanuleid 0,5 või 1 ml IOTest 3 iksaatorlahusega (viitenr A07800) töökonsentratsioonil (1X). Sedasi fikseerituna saab valmissegusid säilitada 2 uni 8 °C juures valguse eest kaitstuna kuni 24 tundi.

B - intratsütoplasmaatiline ja membraanne värvimine

Proovis tohib olla punaseid vereliblesid vähem kui 6×10^6 μl kohta ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Vajaduse korral lahjendage PBS-is.

Proovis tohib olla leukotsüüte vähem kui $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Vajaduse korral lahjendage PBS-is.

Iga analüüsitava proovi korral saab lisaks analüüsikatsutile lisada ühe kontrollkatsuti, kus rakud segatakse konkreetsele valitud värvimismeetodile vastava negatiivse kontrollainega.

1. Lisage igasse katsutisse 50 μl analüüsiproovi.
2. Lisage igasse analüüsikatsutisse vajalik kogus mAb-d (spetsiifiline membraanantigeeni määravale ainele) ja vajaduse korral lisage igasse kontrollkatsutisse sobiv kogus negatiivset kontrollainet.
3. Keerutage ettevaatlikult iga katsutit.
4. Inkubeerige valguse eest kaitstult 15 minutit toatemperatuuril (18–25 °C).
5. Lisage mõlemasse katsutisse 100 μl reagenti 1. Vibratsioonsegage tugevalt kohe pärast iga täiendust.
6. Inkubeerige 15 minutit toatemperatuuril (18–25 °C).
7. Lisage kumbagi katsutisse 4 ml PBS-i.
8. Tsentrifuugige toatemperatuuril 5 minutit 300 \times g juures.
9. Eemaldage aspiratsiooniga pealislahus.

10. Lisage igasse katsutisse 100 µl reagenti 2. ÄRGE VIBRATSIOONSEGAGE, laske reagentil 2 rakugraanulisse loomulikult difundeeruda.
11. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril (18–25 °C) RAPUTAMATA.
12. Raputage käsitsi aeglaselt 2 kuni 3 sekundit.
13. Lisage igasse analüüsikatsutisse vajalik kogus mAb-d (spetsiifiline intratsütoplasmaatilise antigeeni määravale ainele) ja vajaduse korral lisage igasse kontrollkatsutisse sobiv kogus negatiivset kontrollainet.
14. Igasse kontrollkatsutisse lisage 20 µl isotüüp-kontrolli.
15. Keerutage ettevaatlikult iga katsutit.
16. Inkubeerige valguse eest kaitstult 15 minutit toatemperatuuril (18–25 °C).
17. Lisage kumbagi katsutisse 4 ml PBS-i.
18. Tsentrifugeerige toatemperatuuril 5 minutit 300 × g juures.
19. Eemaldage aspireerimisega ülemine vedelikukiht ja suspendeerige uuesti vereliblede graanuleid 0,5 või 1 ml IOTest 3 iksaatorlahusega (viitenr A07800) töökonsentratsioonil (1X). Sedasi fikseerituna saab valmissegusid säilitada 2 kuni 8 °C juures valguse eest kaitstuna kuni 24 tundi.

TOIMIMINE

Toimimisandmed saadakse kasutades ülalkirjeldatud protseduuri vähem kui 24 tundi vanadel antikoagulandi EDTA naatriumsoolaga sterilisesse katsutisse kogutud vereproovidel. Analüüs tehakse 2 tunni jooksul pärast immuunovärvimist.

TÄPSUS

Positiivsete väärtuste protsent määrati täisvere ja luuüdi abil. Igat proovi testiti 4 korda, kaks korda päevas 1 päeva jooksul 2 instrumendil, kasutades 2 permeabiliseeriva reagenti IntraPrep partiid. Mõõtmised (% positiivne) tehti Naviosi voolutsütomeetriaga. Analüüsiti CLSI meetodi EP5-A2 põhjal. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kvantitatiivsete mõõtmismeetodite täpsuse näitajate hindamine).

Meie sobivuskriteeriumid sõltuvad iga populatsiooni kohta mõõdetud positiivsete sündmuste arvust:

- Positiivse sündmuse korral < 1500, CV < 15%
- Positiivse sündmuse korral > 1500, CV < 10%

Täisvere EDTA.

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide puhtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 8877							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetritevaheline	Partiisiline	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide taasteväärtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 8877							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetritevaheline	Partiisiline	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksüdaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine monotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 1070							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetritevaheline	Partiisiline	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksüdaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine granulotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 13246							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetritevaheline	Partiisiline	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Täisvere HEPARIIN.

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide puhtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 6824							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetritevaheline	Partiisiline	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide taasteväärtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 6824							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksuudaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine monotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 961							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksuudaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine granulotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 20742							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Täisvere KHA.

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide puhtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 12355							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide taasteväärtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 12355							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksuudaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine monotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 1483							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksuudaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine granulotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 32715							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Luuüdi EDTA.

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide puhtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 8808							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membraanvärvimine = lümfotsüütide taasteväärtus							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 8808							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksuudaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine monotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 2212							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Müeloperoksuudaasi-FITC-vastane intratsütoplasmaatiline värvimine granulotsüütidel							
Positiivsete sündmuste arv (keskmine) = 33181							
	Kasutajatevaheline	Tsütomeetri vaheline	Partiisene	Partiidevaheline	Testidevaheline	Testisisene	Kokku

CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
TULEMUSED	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LÜMFOTSÜÜTIDE PUHTUS JA TAASTEVÄÄRTUS

Lümfotsüütilist puhtust ning taasteväärtusi on hinnatud CDC soovitude kohaselt (5). 10 terve doonori verd, kellelt võeti EDTA, hepariini ja KHA proovid, ning 5 luuüdi märgistati monoklonaalsete antikehade CD45-FITC ja CD14-PE seguga. Taasteväärtuse ja puhtuse keskmised väärtused ning vahemik on esitatud järgmistes tabelites.

Täisvere EDTA		
Parameeter	Taasteväärtus	Puhtus
Keskmine	93,6	89,7
Min/max	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Täisvere HEPARIIN		
Parameeter	Taasteväärtus	Puhtus
Keskmine	94,3	87,6
Min/max	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Täisvere KHA		
Parameeter	Taasteväärtus	Puhtus
Keskmine	94,2	94,6
Min/max	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Luuüdi EDTA		
Parameeter	Taasteväärtus	Puhtus
Keskmine	80,7	71,8
Min/max	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

PIIRANGUD

- Voolutsütomeetria võib anda valed tulemused, kui tsütomeeter ei ole ideaalselt joondatud, kui fluorestsentsi lekkeid ei ole õigesti kompenseeritud ja kui piirkonnad ei ole hoolikalt paigutatud.
- Teatud antigense määravad tegurid võivad olla tundlikud formaldehüüdi või saponine. Iga labor peab kinnitama kasutustingimusi monokloonsed antikehad.
- Täpsed ja korratavad tulemused saadakse, kui kasutatavad protseduurid on kooskõlas tehnilise teabelehe ja heade laboritavadega.
- See reaktiiv on optimeeritud, et pakkuda parimat konkreetne signaal / mittespetsiifilised signaali suhe. Seetõttu on oluline järgida suhe reaktiiv maht / leukotsüütide arv ja erütrotsüütide iga test.
- Juhul hüpertsellulaarsuse, lahjendatakse proovi PBS, et saada vähem kui 5×10^9 leukotsüütide / L ja vähem kui 6×10^{12} punaliblede / L (6).
- Teatud haigusseisundite (näiteks raske neerupuudulikkuse või hemoglobiнопaatia) korral võib erütrotsüütide lüüsimine olla aeglane, mittetäielik või isegi võimatu. Sellisel juhul on enne värvimist soovitatav mononukleaarsete rakkude isoleerimine tihedusgradiendi (näiteks Ficoll-gradiendi) abil (7).

Vt näiteid ja viiteid lisast.

KAUBAMÄRGID

Beckman Coulter, stiliseeritud logo ning selles juhendis nimetatud ettevõtte Beckman Coulter toote- ja teenusemärgid on ettevõtte Beckman Coulter, Inc. kaubamärgid või registreeritud kaubamärgid Ameerika Ühendriikides ja teistes riikides.

LISATEAVE

Patsiendile / kasutajale / muule osapoolle Euroopa Liidus ja identse regulatsioonirežiimiga riikides (määrus (EL) nr 2017/746 in vitro diagnostikameditsiiniseadmete kohta), kui selle seadme kasutamise ajal või selle kasutamise tagajärjel on toimunud tõsine vahejuhtum, teatage sellest tootjale ja/või tema volitatud esindajale ning teie riiklikult pädevale asutusele.

VERSIOONI AJALUGU

REVISION AF:	Avaldamise kuupäev: jaanuar 2021
REVISION AW:	
Värskendused, mis vastavad Beckman Coulteri ülemaailmse märgistamise poliitikale ja IVD-R (EL) 2017/746 nõuetele:	
Lisatud osad	Sihtkasutaja, Täpsus, Lümfotsüütide taasteväärtus ja puhtus, Lisateave, Versiooni ajalugu
Lisatud informatsioon	Vt jaotisi Hoiatus ja ettevaatusabinõud, Säilitamine ja stabiilsus, Piirangud

Uuendatud jaotised	Hoiatus ja ettevaatusabinõud, GHS-i ohuklassifikatsioon, Säilitamine ja stabiilsus, Riknemise tunnused, Protseduur, Toimimine
Eemaldatud osad	Laborisisene korratavus

Sümboli tähis

Sümbolite mõisted on kättesaadavad veebilehel beckman.com/techdocs (dokument nr B60062)

	Reagens 1	Reagens 2
	Fiksacijsko sredstvo	Sredstvo permeabilnosti
Oblik	Tekućina	Tekućina
Aktivna tvar	Formaldehid	Saponin
Volumen	5 mL	5 mL
Broj bočica	3 bočice	3 bočice
Volumen po testiranju	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testova; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / testu

Za *in vitro* dijagnostičku uporabu

NAMJENA

IntraPrep se sastoji od dva reagensa spremna za upotrebu, koji potiču permeabilnost u citoplazmatskoj membrani leukocita za prikazivanje intracelularnih antigenskih determinanti pomoću monoklonskih fluorescentnih antitijela. IntraPrep se koristi za pripremu bioloških uzoraka za analizu protočnom citometrijom. On je optimiziran s ciljem minimalizacije nespecifičnog obojenja u ovom tipu analize (1,2,3,4).

NAČELO

Kao prvi korak, stanice su fiksirane s reagensom 1. Nakon ispiranja, permeabilnost se inducira s reagensom 2, a preostali eritrociti se liziraju. Tijekom ove faze, stanice dolaze u kontakt s konjugiranim monoklonskim antitijelima specifičnim za intracelularne antigenske determinante. Leukociti se zatim analiziraju protočnom citometrijom.

Prikaz površinskih antigenskih determinanti i pored toga je moguć. U tom slučaju, specifična konjugirana monoklonska antitijela se inkubiraju prije fiksacije.

Protočni citometar mjeri difuziju svjetla i fluorescenciju stanica. To omogućuje lokalizaciju interesne populacije unutar elektroničnog prozora definiranog na histogramu, koji uspoređuje ortogonalnu difuziju svjetla (zrnatost ili SS) i difuziju svjetlosti pod malim kutom (veličinu ili FS). Drugi histogrami kombiniraju dva različita parametra dostupna na citometru koja se mogu koristiti kao potpora u fazi ograđivanja stanične populacije ovisno o aplikaciji koju je odabrao korisnik.

Analizira se fluorescencija ograničenih stanica da bi se pozitivno obojeni događaji odvojili od neobojenih. Rezultati se izražavaju kao postotak pozitivnih događaja u odnosu na sve događaje dobivene ograđivanjem.

CILJNI KORISNIK

Proizvod je namijenjen za profesionalnu laboratorijsku uporabu.

UZORCI

Uzorci venske krvi ili koštane srži moraju se uzeti sterilnim epruvetama za uzorke koje sadrže EDTA sol ili ACD ili heparin kao antikoagulans.

Uzorci se moraju čuvati na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C) i ne smiju se potresati. Uzorak se treba homogenizirati pažljivim miješanjem prije uzimanja probnog uzorka.

Uzorci venske krvi moraju se analizirati u roku od 24 sata od njihova uzimanja.

UPOZORENJE I MJERE OPREZA

1. Reagens nemojte upotrebljavati nakon isteka roka trajanja.
2. Nemojte zamrzavati.
3. Smanjite izlaganje svjetlu.
4. Izbjegavajte mikrobnu kontaminaciju reagensa ili može doći do netočnih rezultata.
5. Reagens 1 sadrži formaldehid. Formaldehid je otrovan i izaziva alergije. Smatra se kancerogenim agensom.
6. S otopinama antitijela koje sadržavaju Natrijev azid (NaN_3) potrebno je postupati s posebnim oprezom. Nemojte ih uzimati oralno te izbjegavajte dodir s kožom, sluznicom i očima. Nadalje, natrij-azid može u kiselom mediju formirati potencijalno opasnu dušikovodičnu kiselinu. Kod odlaganja ga je potrebno razrijediti s puno vode, tj. prije nego ga ispustite u kanalizacijske cijevi radi izbjegavanja nakupljanja u metalnim cijevima i smanjivanja rizika od eksplozije.
7. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno zaraznima te je njima potrebno rukovati oprezno (odnosno nositi zaštitne rukavice, odjeću i naočale).
8. Nikada ne pipetirajte ustima te izbjegavajte doticaj uzoraka s kožom, sluznicom i očima.
9. Epruvete s krvlju i otpadni materijal za rukovanje treba odložiti u jednokratne spremnike namijenjene za spaljivanje.

10. Reagense i otpad potrebno je ukloniti u skladu s lokalnim zahtjevima.

KLASIFIKACIJA OPASNOSTI PREMA GHS-U

Reagens 1: fiksiranje

OPASNOST



H302	Štetno ako se proguta.
H313	Može biti štetna u kontaktu s kožom.
H314	Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka.
H317	Može izazvati alergijsku reakciju na koži.
H341	Sumnja na moguća genetska oštećenja.
H350	Može uzrokovati rak.
H370	Uzrokuje oštećenje organa.
P201	Prije uporabe pribaviti posebne upute.
P280	Nosite zaštitne rukavice, zaštitnu odjeću i zaštitu za oči/lice.
P303+P361+P353	U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM (ili kosom): Isprati kožu vodom.
P305+P351+P338	U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispirati.
P310	Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika. Metanol 1 - 2 % Formaldehid 5 - 10 %



Sigurnosno-tehnički list dostupan je na adresi beckman.com/techdocs

POHRANA I STABILNOST

IntraPrep čuva se na 18 – 25 °C.

Stabilnost zatvorene bočice: reagens je stabilan 517 dana.

Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 90 dana.

Na web-mjestu www.beckman.com pogledajte Certifikat o analizi specifičan za lot koji upotrebljavate.

DOKAZ PROPADANJA

Svaka promjena fizičkog izgleda reagensa može upućivati na propadanje te se reagens ne smije upotrebljavati.

Ako su vam potrebne dodatne informacije ili ste primili oštećen proizvod, nazovite korisnički servis tvrtke Beckman Coulter na 800-742-2345 (u SAD-u ili Kanadi) ili se obratite lokalnom predstavniku tvrtke Beckman Coulter.

SADRŽAJ

Konzervans s natrijevim azidom može stvoriti eksplozivne spojeve u metalnim cjevovodima. Pogledajte bilten NIOSH: Explosive Azide Hazard (Opasnost od eksplozije azida) (16. 8. 76.).

Da biste spriječili moguće taloženje komponenata azida, prilikom odlaganja nerazrijeđenog reagensa u otpad odvodne cijevi isperite vodom. Odlaganje natrijeva azida u otpad mora biti u skladu s odgovarajućim lokalnim propisima.

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU DIO KOMPLETA:

- Epruvete za uzorke i materijal potreban za uzimanje uzoraka.
- Automatske pipete s jednokratnim vrhom za 10, 20, 50, 100 i 500 µL.
- Plastične hemolitičke epruvete.
- Specifična monoklonska antitijela (mAb).
- Negativne kontrole.

- Reagens za fiksiranje leukocita. Na primjer: Otopina za fiksiranje IOTest 3 (ref. A07800).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijeva fosfata, 0,145 M natrijeva klorida, pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska miješalica (tip vorteks).
- Citometar toka.

POSTUPAK

A - Intracitoplazmatsko bojenje

Broj crvenih krvnih stanica koje su prisutne u uzorku treba biti manji od 6×10^6 po μL (6×10^{12} /L). Razrijedite ako je potrebno u PBS.

Broj leukocita prisutnih u uzorku mora biti manji od $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Razrijedite ako je potrebno u PBS.

Za svaki uzorak koji se analizira može se uz ispitnu epruvetu dodati jedna kontrolna epruveta u kojoj su stanice pomiješane s negativnom kontrolom koja odgovara odabranom postupku bojenja.

1. U svaku epruvetu dodajte 50 μL ispitnog uzorka.
2. U svaku epruvetu dodajte 100 μL reagensa 1. Nakon svakog dodavanja smjesta brzo promiješajte u vorteks-miješalici.
3. Inkubirajte 15 minuta na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C).
4. Dodajte 4 mL PBS-a u svaku epruvetu.
5. Centrifugirajte 5 minuta pri 300 x g na sobnoj temperaturi.
6. Uklonite supernatant aspiracijom.
7. U svaku epruvetu dodajte 100 μL reagensa 2. NEMOJTE MIJEŠATI U VORTEKS-MIJEŠALICI; ostavite reagens 2 da se prirodno rasprši u stanična zrnca.
8. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi (18 –25 °C) BEZ POTRESANJA.
9. Polako potresajte rukom 2 do 3 sekunde.
10. U svaku ispitnu epruvetu dodajte potrebnu količinu mAb-a (specifičnog za intracitoplazmatsku antigensku determinantu) i po potrebi u svaku kontrolnu epruvetu dodajte odgovarajuću količinu negativne kontrole.
11. Pažljivo pojedinačno provrtite u miješalici svaku epruvetu.
12. Inkubirajte 15 min na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C), zaštićeno od svjetlosti.
13. Dodajte 4 mL PBS-a u svaku epruvetu.
14. Centrifugirajte 5 minuta pri 300 x g na sobnoj temperaturi.
15. Aspiracijom uklonite supernatant i resuspendirajte stanični sediment u 0.5 ili 1 mL IOTest 3 fiksacijske otopine (Ref. A07800) pri njezinoj radnoj koncentraciji (1X). Tako fiksirani, pripravci se mogu čuvati između 2 i 8 °C, zaštićeni od svjetla tijekom 24 sata.

B - Intracitoplazmatsko i membranozno bojenje.

Broj crvenih krvnih stanica koje su prisutne u uzorku treba biti manji od 6×10^6 po μL (6×10^{12} /L). Razrijedite ako je potrebno u PBS.

Broj leukocita u uzorku treba biti manji od $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Razrijedite ako je potrebno u PBS.

Za svaki uzorak koji se analizira može se uz ispitnu epruvetu dodati jedna kontrolna epruveta u kojoj su stanice pomiješane s negativnom kontrolom koja odgovara odabranom postupku bojenja.

1. U svaku epruvetu dodajte 50 μL ispitnog uzorka.
2. U svaku ispitnu epruvetu dodajte potrebnu količinu mAb-a (specifičnog za membransku antigensku determinantu) i po potrebi u svaku kontrolnu epruvetu dodajte odgovarajuću količinu negativne kontrole.
3. Pažljivo pojedinačno provrtite u miješalici svaku epruvetu.
4. Inkubirajte 15 min na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C), zaštićeno od svjetlosti.
5. U svaku epruvetu dodajte 100 μL reagensa 1. Nakon svakog dodavanja smjesta brzo promiješajte u vorteks-miješalici.
6. Inkubirajte 15 minuta na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C).
7. Dodajte 4 mL PBS-a u svaku epruvetu.
8. Centrifugirajte 5 minuta pri 300 x g na sobnoj temperaturi.
9. Uklonite supernatant aspiracijom.

10. U svaku epruvetu dodajte 100 µL reagensa 2. NEMOJTE MIJEŠATI U VORTEKS-MIJEŠALICI; ostavite reagens 2 da se prirodno rasprši u stanična zrnca.
11. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi (18 –25 °C) BEZ POTRESANJA.
12. Polako potresajte rukom 2 do 3 sekunde.
13. U svaku ispitnu epruvetu dodajte potrebnu količinu mAb-a (specifičnog za intracitoplazmatsku antigensku determinantu) i po potrebi u svaku kontrolnu epruvetu dodajte odgovarajuću količinu negativne kontrole.
14. U svaku epruvetu s kontrolom, dodajte 20 µL izotipne kontrole.
15. Pažljivo pojedinačno provrtite u miješalici svaku epruvetu.
16. Inkubirajte 15 min na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C), zaštićeno od svjetlosti.
17. Dodajte 4 mL PBS-a u svaku epruvetu.
18. Centrifugirajte 5 minuta pri 300 x g na sobnoj temperaturi.
19. Aspiracijom uklonite supernatant i resuspendirajte stanični sediment u 0.5 ili 1 mL IOTest 3 fiksacijske otopine (Ref. A07800) pri njezinoj radnoj koncentraciji (1X). Tako fiksirani, pripravci se mogu čuvati između 2 i 8 °C te zaštićeni od svjetla tijekom 24 sata.

PERFORMANSE

Podaci o performansama dobivaju se prethodno opisanim postupkom na manje od 24 sata starim uzorcima krvi prethodno prikupljenima u sterilne epruvete uz EDTA sol kao antikoagulans. Analiza se provodi u roku od 2 sata nakon imunobojenja.

PRECIZNOST

Postotne pozitivne vrijednosti utvrđene su pomoću pune krvi i koštane srži. Svaki je uzorak obrađen 4 puta, dvaput dnevno tijekom 1 dana na 2 instrumenta uz 2 lota reagensa za permeabilizaciju IntraPrep. Mjerenja (% pozitivnih vrijednosti) provedena su s pomoću protočnog citometra Navios. Analiza je provedena na temelju metode EP5-A2 Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI): Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Procjena radnih značajki preciznosti metoda kvantitativnog mjerenja).

Naši kriteriji prihvatljivosti ovise o broju pozitivnih događaja izmjerenih za svaku populaciju:

- Ako je pozitivni događaj < 1500, CV < 15 %
- Ako je pozitivni događaj > 1500, CV < 10 %

Puna krv u EDTA-i:

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 8877							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = iskoristivost limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 8877							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 1070							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 13246							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Puna krv u HEPARINU:

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 6824							

	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = iskoristivost limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 6824							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 961							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 20742							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Puna krv u ACD-i:

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 12355							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = iskoristivost limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 12355							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 1483							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 32715							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Koštana srž u EDTA-i:

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 8808							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko bojenje antigenom CD45/CD14 = iskoristivost limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 8808							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno

CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 2212							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazmatsko bojenje anti-mijeloperoksidazom-FITC na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrijednost) = 33181							
	Među operatorima	Među citometrima	Unutar lota	Među lotovima	Među obradama	Unutar obrade	Ukupno
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ČISTOĆA I ISKORISTIVOST LIMFOCITA

Čistoća i iskoristivost limfocita procijenjeni su prema preporukama CDC-a (5). Uzorci krvi 10 zdravih donora prikupljeni u EDTA-i, heparinu i ACD-u te 5 uzoraka koštane srži označeni su mješavinom monoklonskih antitijela CD45-FITC i CD14-PE. Srednje vrijednosti iskoristivosti i čistoće te raspon navedeni su u sljedećim tablicama:

Puna krv u EDTA-i		
Parametar	Iskoristivost	Čistoća
Prosjek	93,6	89,7
min./maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Puna krv u HEPARINU		
Parametar	Iskoristivost	Čistoća
Prosjek	94,3	87,6
min./maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Puna krv u ACD-u		
Parametar	Iskoristivost	Čistoća
Prosjek	94,2	94,6
min./maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Koštana srž u EDTA-i		
Parametar	Iskoristivost	Čistoća
Prosjek	80,7	71,8
min./maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može proizvesti pogrešne rezultate ako citometar nije savršeno poravnat, ako fluorescentna curenja nisu pravilno kompenzirana i ako regije nisu pažljivo pozicionirane.
2. Određene antigenske determinante mogu biti osjetljive na formaldehid ili na saponine. Svaki laboratorij mora validirati uvjete za primjenu monoklonskih antitijela.
3. Točni i ponovljivi rezultati dobivat će se sve dok se postupci izvode u skladu s tehničkom brošurom i u skladu s dobrim laboratorijskim praksama.
4. Ovaj reagens je optimiziran tako da pruža najbolji omjer specifičnog/nеспецифичnog signala. Stoga je važno pridržavati se omjera volumena reagensa/broja leukocita i eritrocita u svakom testu.
5. U slučaju hipercelularnosti, razrijedite uzorak u PBS tako da dobijete manje od 5×10^9 leukocita / L i manje od 6×10^{12} crvenih krvnih stanica/L (6).
6. Pri određenim bolestima, kao što je ozbiljno zatajenje bubrega ili hemoglobinopatije, liziranje eritrocita može biti sporo, nepotpuno ili čak i nemoguće. U tom se slučaju prije bojenja preporučuje izoliranje jednojezgrenih stanica s pomoću gradijenta gustoće (na primjer, Ficoll) (7).

Za primjere i reference pogledajte Dodatak.

ŽIGOVI

Beckman Coulter, stilizirani logotip te oznake proizvoda i usluga tvrtke Beckman Coulter žigovi su ili registrirani žigovi tvrtke Beckman Coulter, Inc. u Sjedinjenim Američkim Državama i drugim državama.

DODATNE INFORMACIJE

Za pacijenta / korisnika / treću stranu u Europskoj uniji i u državama s identičnim regulatornim režimom (Uredba 2017/746/EU o medicinskim proizvodima za in vitro dijagnostiku): ako tijekom upotrebe ovog uređaja ili kao rezultat njegove upotrebe dođe do ozbiljnog štetnog događaja, prijavite ga proizvođaču i/ili njegovu ovlaštenom zastupniku te nadležnom nacionalnom tijelu.

POVIJEST REVIZIJA

REVIZIJA AF:	Datum objave: siječanj 2021.
REVIZIJA AW:	
Ažuriranja radi usklađivanja s pravilnikom o globalnom označavanju tvrtke Beckman Coulter i u skladu sa zahtjevima uredbe (EU)2017/746 o in vitro dijagnostičkim medicinskim proizvodima (IVD-R):	
Dodani odjeljci	Ciljni korisnik, Preciznost, Iskoristivost i čistoća limfocita, Dodatne informacije, Povijest revizija
Dodane informacije	Pogledajte odjeljke Upozorenje i mjere opreza, Čuvanje i stabilnost, Ograničenja
Ažurirani odjeljci	Upozorenje i mjere opreza, Klasifikacija opasnosti prema sustavu GHS, Čuvanje i stabilnost, Vidljivi znakovi propadanja, Postupak, Performanse
Uklonjeni odjeljci	Unutarlaboratorijska obnovljivost

Pojmovnik simbola

Pojmovnik simbola dostupan je na web-mjestu beckman.com/techdocs (broj dokumenta B60062)

	Реактив 1	Реактив 2
	Фиксиращ агент	Препарат за изследване на пропускливост
Форма	Течност	Течност
Активно вещество	Формалдехид	Сапонин
Обем	5 mL	5 mL
Брой флакони	3 шишета	3 шишета
Обем за един тест	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 теста; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / тест

За *in vitro* диагностика

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

IntraPrep се състои от два готови за употреба реактива, които предизвикват пропускливост при цитоплазмената мембрана на левкоцитите за демонстрирането на вътреклетъчни антигенни детерминанти с помощта на флуоресцентно оцветени моноклонални антитела. IntraPrep се използва за подготовка на биологични проби за анализ чрез поточна цитометрия. Той е оптимизиран, за да се сведе до минимум неспецифичното оцветяване при този тип анализ (1,2,3,4).

ПРИНЦИП

Като първа стъпка, клетките се фиксират с реактив 1. След промиването чрез реактив 2 се предизвиква пропускливост и останалите еритроцити се лизират. През този етап клетките се поставят в контакт с конюгирани моноклонални антитела, специфични за вътреклетъчните антигенни детерминанти. След това левкоцитите се анализират чрез поточна цитометрия.

Въпреки това, демонстрацията на повърхностни антигенни детерминанти остава възможна. В този случай конкретните конюгирани моноклонални антитела се инкубират преди фиксиране.

Поточният цитометър измерва разсейването на светлината и флуоресценцията на клетките. Той прави възможна локализацията на популацията, която е обект на интерес, в електронния прозорец, определен в хистограмата, която съпоставя ортогоналното разсейване на светлината (Странично разпръскване или SP) и разсейването на концентрираната светлина (Предно разпръскване, или PR). Други хистограми, комбиниращи два от различните параметри, налични на цитометъра, могат да бъдат използвани за помощ при етапа на стробиране в зависимост от приложението, избрано от потребителя.

Флуоресценцията на разграничените клетки се анализира, за да се разграничат позитивно оцветените събития от неочетените такива. Резултатите се изразяват като процент на положителни събития във връзка с всички събития, получени от определянето на областта за анализ.

ПРЕДВИДЕН ПОТРЕБИТЕЛ

Този продукт е предназначен само за лабораторна професионална употреба.

ПРОБИ

Венозна кръв или проби от костен мозък трябва да се вземат в стерилни епруветки, съдържащи сол EDTA, ACD или хепарин като антикоагулант.

Пробите трябва да бъдат съхранявани при стайна температура (18 – 25°C) и не трябва да бъдат разклащани. Пробата трябва да се хомогенизира чрез леко разклащане, преди да вземе пробата за тестване.

Пробите трябва да бъдат анализирани в рамките на 24 часа от венوپунктурата.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Не използвайте реактива след изтичане на срока на годност.
2. Не замразявайте.
3. Минимизирайте излагането на светлина.
4. Избягвайте микробно замърсяване на реактивите, в противен случай е възможно да се получат погрешни резултати.
5. Реактив 1 съдържа формалдехид. Формалдехидът е токсичен и алергенен. Той се счита за канцерогенно вещество.

6. Реактив 2 натриев азид (NaN_3). С него трябва да се борови внимателно. Не приемайте вътрешно и избягвайте всякакъв контакт с кожата, лигавиците и очите. Освен това, в кисела среда, натриевият азид може да образува потенциално опасната азотоводородна киселина. Ако реактивът трябва да бъде изхвърлен, се препоръчва да бъде разреден в голям обем вода, преди да бъде излят в канализацията, за да се избегне натрупването на натриев азид в металните тръби да се предотврати рискът от експлозия.
7. Всички кръвни проби трябва да се считат за потенциално заразни и с тях трябва да се борови внимателно (по-специално: носене на защитни ръкавици, облекло и очила).
8. Никога не пипетирайте с уста и избягвайте всякакви контакти между пробите и Вашата кожа, лигавица и очи.
9. Епруветките за кръв и материалите за еднократна употреба, използвани за боравене, трябва да се изхвърлят във временни контейнери, предназначени за изгаряне.
10. Реактивите и отпадъците трябва да бъдат елиминирани в съответствие с местните изисквания.

КЛАСИФИЦИЯ НА ОПАСНОСТИТЕ ПО GHS

Реактив 1: Фиксация

ОПАСНО



H302	Вреден при поглъщане.
H313	Може да бъде вредно при контакт с кожата.
H314	Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите.
H317	Може да причини алергична кожна реакция.
H341	Предполага се, че причинява генетични дефекти.
H350	Може да причини рак.
H370	Причинява увреждане на органите.
P201	Преди употреба се снабдете със специални инструкции.
P280	Използвайте предпазни ръкавици, предпазно облекло, предпазни очила и предпазна маска за лице.
P303+P361+P353	ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА (или с косата): Облейте кожата с вода.
P305+P351+P338	ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате.
P310	Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. Метанол 1 - 2 % Формалдехид 5 - 10 %



Информационният лист за безопасност е наличен на beckman.com/techdocs

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

IntraPrep се съхранява при температура от 18 – 25°C.

Стабилност на затворен флакон: реактивът е стабилен за 517 дни.

Стабилност на отворен флакон: реактивът е стабилен за 90 дни.

Вижте Сертификата за анализ за конкретната партида на www.beckman.com.

ДАНИ ЗА ВЛОШАВАНЕ

Всяка промяна във физическия изглед на реактивите може да е признак за влошаване и реактивът не трябва да бъде използван.

За допълнителна информация или при получаване на повреден продукт се свържете с отдела за обслужване на клиенти на Beckman Coulter на тел. 800-742-2345 (САЩ или Канада) или се свържете с местния представител на Beckman Coulter.

СЪДЪРЖАНИЕ

Консервантът натриев азид може да образува експлозивни съединения в метални отводнителни тръбопроводи. Вижте Бюлетина на NIOSH: Explosive Azide Hazard (Бюлетин на Националния институт по безопасност и хигиена на труда: Опасност от експлозия на азид) (16/8/76).

За да избегнете възможно натрупване на азидни съединения, промивайте канализационните тръби с вода след изхвърляне на неразтворен реактив. Изхвърлянето на натриев азид трябва да бъде в съответствие с местните разпоредби.

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ДОСТАВЕНИ С КОМПЛЕКТА:

- Епруветки за проби и материали, необходими за вземане на проби.
- Автоматични пипети с върхове за еднократна употреба за 10, 20, 50, 100 и 500 μL .
- Пластмасови хемолизни епруветки.
- Специфични моноклонални антитела (mAb).
- Отрицателни контроли.
- Реактив за левкоцитна фиксация. Например: IOTest 3 фиксиращ разтвор (Реф. A07800).
- Буфер (PBS: 0,01 M натриев фосфат; 0,145 M натриев хлорид; pH 7,2).
- Центрофугирайте.
- Автоматичен агитатор (тип вортекс).
- Поточен цитометър.

ПРОЦЕДУРА

А - Интрацитоплазмено оцветяване

Броят на наличните червени кръвни клетки в пробата трябва да бъде по-малък от 6×10^6 за μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Ако е необходимо, разтворете във фосфатен буферен разтвор.

Броят на наличните левкоцити в пробата трябва да бъде по-малък от $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Ако е необходимо, разтворете във фосфатен буферен разтвор.

За всяка анализирана проба освен тестовата епруветка може да се добави една контролна епруветка, в която клетките се смесват при наличие на отрицателна контрола, съответстваща на специфичното избрано оцветяване.

1. Добавете 50 μL от тестовата проба във всяка епруветка.
2. Добавете 100 μL от реактив 1 към всяка епруветка. Разбърквайте на вортекс щателно веднага след всяко добавяне.
3. Инкубирайте за 15 минути на стайна температура (18 – 25°C).
4. Добавете по 4 mL PBS във всяка епруветка.
5. Центрофугирайте 5 минути при 300 x g на стайна температура.
6. Отстранете надутаечната течност чрез аспирация.
7. Добавете 100 μL от реактив 2 във всяка епруветка. НЕ РАЗБЪРКВАЙТЕ НА ВОРТЕКС, оставете реактив 2 да дифундира естествено в клетъчната утайка.
8. Инкубирайте за 5 минути на стайна температура (18 – 25°C), БЕЗ ДА РАЗКЛАЩАТЕ.
9. Разклатете бавно на ръка за 2 до 3 секунди.
10. Добавете необходимото количество mAb (специфично за интрацитоплазмена антигенна детерминанта) към всяка тестова епруветка и, ако е необходимо, подходящото количество отрицателна контрола към всяка контролна епруветка.
11. Внимателно завъртете епруветка по епруветка.
12. Инкубирайте за 15 минути при стайна температура (18–25°C), като предпазвате от светлина.
13. Добавете по 4 mL PBS във всяка епруветка.
14. Центрофугирайте 5 минути при 300 x g на стайна температура.
15. Премахнете надутаечната течност чрез аспирация и ресуспендирайте клетъчната утайка в 0,5 или 1 mL от IOTest 3 фиксиращ разтвор (Реф. A07800) в работната му концентрация (1X). Фиксиран по този начин, подготвеният продукт може да се съхранява между 2 и 8°C далеч от светлина в продължение на 24 часа.

В - Интрацитоплазмено и мембранно оцветяване

Броят на наличните червени кръвни клетки в пробата трябва да бъде по-малък от 6×10^6 за μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Ако е необходимо, разтворете във фосфатен буферен разтвор.

Броят на наличните левкоцити в пробата трябва да бъде по-малък от $5 \times 10^9/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Ако е необходимо, разтворете във фосфатен буферен разтвор.

За всяка анализирана проба освен тестовата епруветка може да се добави една контролна епруветка, в която клетките се смесват при наличие на отрицателна контрола, съответстваща на специфичното избрано оцветяване.

1. Добавете 50 μL от тестовата проба във всяка епруветка.
2. Добавете необходимото количество mAb (специфично за мембранна антигенна детерминанта) към всяка тестова епруветка и, ако е необходимо, добавете подходящото количество отрицателна контрола към всяка контролна епруветка.
3. Внимателно завъртете епруветка по епруветка.
4. Инкубирайте за 15 минути при стайна температура (18–25°C), като предпазвате от светлина.
5. Добавете 100 μL от реактив 1 към всяка епруветка. Разбърквайте на вортекс щателно веднага след всяко добавяне.
6. Инкубирайте за 15 минути на стайна температура (18 – 25°C).
7. Добавете по 4 mL PBS във всяка епруветка.
8. Центрофугирайте 5 минути при 300 x g на стайна температура.
9. Отстранете надутаечната течност чрез аспирация.
10. Добавете 100 μL от реактив 2 във всяка епруветка. НЕ РАЗБЪРКВАЙТЕ НА ВОРТЕКС, оставете реактив 2 да дифундира естествено в клетъчната утайка.
11. Инкубирайте за 5 минути на стайна температура (18 – 25°C), БЕЗ ДА РАЗКЛАЩАТЕ.
12. Разклатете бавно на ръка за 2 до 3 секунди.
13. Добавете необходимото количество mAb (специфично за интрацитоплазмена антигенна детерминанта) към всяка тестова епруветка и, ако е необходимо, подходящото количество отрицателна контрола към всяка контролна епруветка.
14. Във всяка контролна епруветка добавете 20 μL изотопна контрола.
15. Внимателно завъртете епруветка по епруветка.
16. Инкубирайте за 15 минути при стайна температура (18–25°C), като предпазвате от светлина.
17. Добавете по 4 mL PBS във всяка епруветка.
18. Центрофугирайте 5 минути при 300 x g на стайна температура.
19. Премахнете надутаечната течност чрез аспирация и ресуспендирайте клетъчната утайка в 0,5 или 1 mL от IOTest 3 фиксиращия разтвор (Реф. A07800) в работната му концентрация (1X). Фиксиран по този начин, подготовеният продукт може да се съхранява между 2 и 8°C далеч от светлина в продължение на 24 часа.

РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Данните за ефективността се получават с помощта на описаната по-горе процедура за кръвни проби до 24 часа, предварително събрани в стерилни епруветки със сол EDTA като антикоагулант. Анализ се извършва в рамките на 2 часа след имунооцветяване.

ТОЧНОСТ

Процентните положителни стойности са определени посредством цялостна кръв и костен мозък. Всяка проба е обработена 4 пъти, два пъти на ден за 1 ден на 2 инструмента, като са използвани 2 партиди реактив за пермеабилзация IntraPrep. Измерванията (% положителни) са направени на поточен цитометър Navios. Процедурният анализ е извършен въз основа на CLSI метода EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods. (Метод EP5-A2 на CLSI: Оценка на точността на методите за количествено измерване.)

Нашите критерии за приемливост зависят от броя положителни събития, измерени за всяка популация:

- Ако положителните събития са < 1500 , CV $< 15\%$
- Ако положителните събития са > 1500 , CV $< 10\%$

Цялостна кръв EDTA:

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитна чистота
Брой положителни събития (средно) = 8877

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитно възстановяване

Брой положителни събития (средно) = 8877

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху моноцити

Брой положителни събития (средно) = 1070

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху гранулоцити

Брой положителни събития (средно) = 13246

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Цялостна кръв HEPARIN:

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитна чистота

Брой положителни събития (средно) = 6824

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитно възстановяване

Брой положителни събития (средно) = 6824

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху моноцити

Брой положителни събития (средно) = 961

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху гранулоцити

Брой положителни събития (средно) = 20742

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Цялостна кръв ACD:

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитна чистота

Брой положителни събития (средно) = 12355

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитно възстановяване

Брой положителни събития (средно) = 12355

	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
--	-----------------	-----------------	---------------	---------------	-------------	--------------------	------

CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху моноцити							
Брой положителни събития (средно) = 1483							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху гранулоцити							
Брой положителни събития (средно) = 32715							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Костен мозък EDTA:

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитна чистота							
Брой положителни събития (средно) = 8808							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембранно оцветяване = лимфоцитно възстановяване							
Брой положителни събития (средно) = 8808							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху моноцити							
Брой положителни събития (средно) = 2212							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмено оцветяване върху гранулоцити							
Брой положителни събития (средно) = 33181							
	Между оператори	Между цитометри	Вътрепартидна	Между партиди	Между цикли	В рамките на цикъл	Общо
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
РЕЗУЛТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ЛИМФОЦИТНА ЧИСТОТА И ВЪЗСТАНОВЯВАНЕ

Лимфоцитната чистота и възстановяването са оценени съгласно препоръките на Центъра за контрол на заболяванията (5). Кръвта на 10 здрави донора, взети в EDTA, хепарин и ACD, и 5 костни мозъка са белязани със смес от моноклонални антитела CD45-FITC и CD14-PE. Средните стойности на възстановяване и чистота, както и обхватът са дадени в следните таблици:

Цялостна кръв EDTA		
Параметър	Възстановяване	Purity
Среден	93,6	89,7
Мин./Макс.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Цялостна кръв HEPARIN		
Параметър	Възстановяване	Purity
Среден	94,3	87,6
Мин./Макс.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Цялостна кръв ACD		
Параметър	Възстановяване	Purity
Среден	94,2	94,6
Мин./Макс.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Костен мозък EDTA		
Параметър	Възстановяване	Purity
Среден	80,7	71,8
Мин./Макс.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Поточната цитометрия може да даде неточни резултати, ако цитометърът не е бил идеално приравнен, ако течове на флуоресценция не са били правилно компенсирани или ако регионите не са били внимателно позиционирани.
2. Някои антигенни детерминанти могат да бъдат чувствителни към формалдехид или да saponine. Всяка лаборатория трябва да утвърди условията за използване на моноклонални антитела.
3. Ще бъдат получени точни и възпроизводими резултати, при условие, че използваните процедури са в съответствие с техническата листовка и са съвместими с добрите лабораторни практики.
4. Този реактив е оптимизиран така, че да предложи най-доброто специфичен сигнал / неспецифичен съотношението сигнал. Следователно, важно е да се придържат към съотношението на реагент обем / брой на левкоцити и еритроцити във всеки тест.
5. В случай на хиперцелуларност, разрежда образеца в PBS, така че да се получи по-малко от 5×10^9 левкоцити / L и по-малко от 6×10^{12} червени кръвни клетки / L (6)..
6. При определени болестни състояния, например тежка бъбречна недостатъчност или хемоглобинопатии, лизирането на червените кръвни телца може да бъде бавно, непълно или дори невъзможно. В този случай се препоръчва да се изолират мононуклеарни клетки, като се използва градиент на плътността (Ficoll например) преди оцветяване (7).

Вижте Приложението за примери и справки.

ТЪРГОВСКИ МАРКИ

Beckman Coulter, стилизираното лого и марките на продуктите и услугите на Beckman Coulter, присъстващи в този документ, са търговски марки или регистрирани търговски марки на Beckman Coulter, Inc. в САЩ и в други държави.

ДОПЪЛНИТЕЛНА ИНФОРМАЦИЯ

За пациенти/потребители/трети лица в Европейския съюз и в страни с идентичен регулаторен режим (Регламент 2017/746/ЕС относно ин витро диагностичните медицински изделия); ако по време на използването на това изделие или в резултат на използването му е настъпил сериозен инцидент, моля, съобщете за това на производителя и/или неговия упълномощен представител и на Вашия национален орган.

ХРОНОЛОГИЯ НА РЕДАКЦИИТЕ

РЕДАКЦИЯ AF:	Дата на издаване: януари 2021 г.
РЕДАКЦИЯ AW:	
Актуализации с цел съответствие с Глобалната политика за етикетиране на Beckman Coulter и съгласно изискванията на Регламент (ЕС) 2017/746 за медицинските изделия за ин витро диагностика (IVD-R):	
Добавени раздели	Предвиден Целеви потребител, Точност, Лимфоцитно възстановяване и чистота, Допълнителна информация, Предишни редакции
Добавена информация	Вижте раздели Предупреждение и предпазни мерки, Съхранение и стабилност, Ограничения
Актуализирани раздели	Предупреждение и предпазни мерки, Класифициране на опасностите по глобалната хармонизирана система (GHS), Съхранение и стабилност, Данни за влошаване, Процедура, Характеристики
Премахнати раздели	Вътрелaboratorна възпроизводимост

Легенда на символите

Речник на символите е наличен на beckman.com/techdocs (номер на документа B60062)

	試劑 1	試劑 2
	固定劑	透化劑
劑型	液體	液體
活性物質	甲醛	皂素
容量	5 mL	5 mL
瓶數	3 瓶	3 瓶
每次檢測的容量	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 次測試；6 x 5 mL
2 x 0.1 mL / 測試

體外診斷使用

預期用途

IntraPrep 包括兩種即用型試劑，其可誘導白血球的細胞質膜中的滲透性，以便透過螢光單株抗體驗證細胞內抗原決定簇。IntraPrep 用於製備生物檢體，從而用流式細胞術進行分析。IntraPrep 已經過優化，以最大限度地減少此類分析中的非特异性染色 (1,2,3,4)。

原理

第一步是使用試劑 1 固定細胞。洗滌後，使用試劑 2 誘導滲透性，然後裂解剩下的紅血球。在此階段，細胞會接觸細胞內抗原決定簇特異的結合單株抗體。然後透過流式細胞術分析白血球。

然而仍然可能驗證表面抗原決定簇。在這種情況下，應在固定之前培育特异性結合單株抗體。

流式細胞分析儀可測定細胞的光漫射和螢光。這樣可以定位直方圖上定義的電子窗口內的感興趣群體，直方圖可以關聯光的正交漫射（側向角散射，即 SS）和窄角光的漫射（前向角散射，即 FS。）細胞分析儀上可用的結合兩個不同參數的其他直方圖可以用於支持設門階段，具體取決於使用者所選的應用。

為了區分陽性染色事件和未染色事件，對劃定細胞的螢光進行了分析。結果表示為陽性事件相對於圈選所得全部事件的百分比。

預期使用者

本產品為實驗室專用。

樣本

必須使用無菌試管採集靜脈血液或骨髓檢體，試管內應含有 EDTA 鹽、ACD 或肝素作為抗凝劑。

樣本應保存在室溫(18 – 25°C)環境中，且不得搖晃。在提取檢測樣本之前，用輕微搖晃的方式使其均勻攪拌。

檢體必須在靜脈穿刺後 24 小時內進行分析。

警告和預防措施

- 請勿使用過期試劑。
- 切勿冷凍。
- 儘量避免陽光直射。
- 請避免試劑受到微生物污染，否則可能會出現錯誤結果。
- 試劑 1 含有甲醛。甲醛具有毒性和致敏性。普遍認為它是一種致癌物質。
- 試劑 2 含有疊氮化鈉 (NaN₃)。必須小心處理。請勿內服，並避免接觸皮膚、黏膜和眼睛。此外，在中度酸性條件下，疊氮化鈉可形成具有潛在危害的疊氮酸。若需要對其進行處置，建議在將試劑倒入排污系統前用大量清水將其稀釋，以避免疊氮化鈉在金屬管道中累積並預防爆炸。
- 所有血液檢體必須視為具有潛在傳染性，且必須小心處理（務必穿戴防護手套、防護衣和護目鏡）。
- 切勿用嘴吸液，並避免檢體接觸皮膚、黏膜和眼睛。
- 用於處理的血液試管和一次性材料應放入焚化專用的特殊容器中處置。
- 應根據當地要求清除試劑和廢棄物。

GHS 危害分類


試劑 1：固定液

危險





H302	吞食有害。
H313	接觸皮膚可能有害
H314	造成嚴重皮膚灼傷和眼部損傷。
H317	可能導致皮膚過敏反應。
H341	可能導致遺傳缺陷。
H350	可能致癌。
H370	造成器官損傷。
P201	使用前應獲取特殊說明。
P280	戴防護手套、穿防護服、戴眼睛/臉部防護物品。
P303+P361+P353	如果接觸皮膚(或頭髮)：用水沖洗皮膚。
P305+P351+P338	如不慎進入眼睛：用清水仔細沖洗數分鐘。如果戴了隱形眼鏡並且容易取出，則取出隱形眼鏡。繼續沖洗。
P310	立即聯絡「毒物諮詢中心」或醫生。 甲醇 1 - 2% 甲醛 5 - 10%

 安全性資料表載於 beckman.com/techdocs

存儲和穩定性

IntraPrep 儲存在 18–25°C 下。

密封瓶穩定性：試劑穩定性可維持 517 天。

開瓶後穩定性：試劑穩定性可維持 90 天。

請參閱 www.beckman.com 參閱各批次專屬的分析證書。

變質的證據

試劑外觀的任何變化表示可能發生變質，因此不應使用該試劑。

如需瞭解其他資訊，或如果收到已損壞的產品，請撥打 800-742-2345 (美國或加拿大) 聯絡貝克曼庫爾特客戶服務部，或聯絡您當地的貝克曼庫爾特代表。

內容物

疊氮化鈉防腐劑可能會在金屬排水管道中形成爆炸性化合物。請參閱 NIOSH Bulletin：Explosive Azide Hazard (爆炸性疊氮化合物危害) (76/8/16)。

為防止疊氮化合物可能累積，丟棄未稀釋的試劑後請用水沖洗污水管。必須依照相關當地法規丟棄疊氮化鈉。

試劑盒未提供但卻需要的材料：

- 採樣時需要採樣試管和材料。
- 可吸取 10、20、50、100 和 500 µL 的帶有一次性吸頭的自動移液器。
- 塑膠溶血試管。
- 特異性單株抗體 (mAb)。
- 陰性品管劑。
- 白血球固定試劑。舉例：IOTest 3 固定液 (參考 A07800)。
- 緩衝劑 (PBS：0.01 M 磷酸鈉；0.145 M 氯化鈉；pH 7.2)。
- 離心機。
- 自動攪拌器 (漩渦型)。
- 流式細胞分析儀器。

程序

A - 細胞質內染色

檢體中的紅血球數量應少於 6×10^6 個/µL (6×10^{12} 個/L)。必要時在 PBS 中稀釋。

檢體中的白血球數量應少於 5×10^3 個/ μL (5×10^9 個/L)。必要時在 PBS 中稀釋。

對於已分析的每份檢體，除使用測試試管外，還可使用一個品管劑試管，在其中混合細胞與對應於所選之特異性染色的陰性品管劑。

1. 在每個試管中添加 50 μL 測試檢體。
2. 在各試管中添加 100 μL 試劑 1。每次添加後立即用力漩渦振蕩。
3. 在室溫 (18–25°C) 下培育 15 分鐘。
4. 向每個試管中添加 4 mL PBS。
5. 在室溫下以 300 x g 離心處理 5 分鐘。
6. 吸除上清液。
7. 在每個試管中添加 100 μL 的試劑 2。請勿漩渦振蕩，讓試劑 2 自然擴散到細胞團塊中。
8. 在室溫 (18–25°C) 下培育 5 分鐘，請勿晃動。
9. 用手輕輕搖晃 2–3 秒。
10. 在每個測試試管中添加必要的 mAb 量 (特異於細胞漿內抗原決定簇)，必要時在每個品管劑試管中添加適量的陰性品管劑。
11. 逐管輕輕漩渦振蕩。
12. 在室溫 (18~25°C) 下避光反應 15 分鐘。
13. 向每個試管中添加 4 mL PBS。
14. 在室溫下以 300 x g 離心處理 5 分鐘。
15. 吸取出上層清液，並在 0.5 或 1 mL 工作濃度 (1X) 的 IOTest 3 固定液 (REF A07800) 中重懸細胞團塊。經如此固定的製備品可於 2–8°C 下避光儲存 24 小時。

B - 細胞質內和細胞膜染色

檢體中的紅血球數量應少於 6×10^6 個/ μL (6×10^{12} 個/L)。必要時使用 PBS 稀釋。

檢體中的白血球數量應少於 5×10^3 個/ μL (5×10^9 個/L)。必要時使用 PBS 稀釋。

對於已分析的每份檢體，除使用測試試管外，還可使用一個品管劑試管，在其中混合細胞與對應於所選之特異性染色的陰性品管劑。

1. 在每個試管中添加 50 μL 測試檢體。
2. 在每個測試試管中添加必要的 mAb 量 (特異於細胞膜抗原決定簇)，必要時在每個品管劑試管中添加適量的陰性品管劑。
3. 逐管輕輕漩渦振蕩。
4. 在室溫 (18–25°C) 下避光反應 15 分鐘。
5. 在各試管中添加 100 μL 試劑 1。每次添加後立即用力漩渦振蕩。
6. 在室溫 (18–25°C) 下培育 15 分鐘。
7. 向每個試管中添加 4 mL PBS。
8. 在室溫下以 300 x g 離心處理 5 分鐘。
9. 吸除上清液。
10. 在每個試管中添加 100 μL 的試劑 2。請勿漩渦振蕩，讓試劑 2 自然擴散到細胞團塊中。
11. 在室溫 (18–25°C) 下培育 5 分鐘，請勿晃動。
12. 用手輕輕搖晃 2–3 秒。
13. 在每個測試試管中添加必要的 mAb 量 (特異於細胞漿內抗原決定簇)，必要時在每個品管劑試管中添加適量的陰性品管劑。
14. 向每個質控品試管中添加 20 μL 同型質控品。
15. 逐管輕輕漩渦振蕩。
16. 在室溫 (18~25°C) 下避光反應 15 分鐘。
17. 向每個試管中添加 4 mL PBS。
18. 在室溫下以 300 x g 離心處理 5 分鐘。
19. 吸取出上層清液，並在 0.5 或 1 mL 工作濃度 (1X) 的 IOTest 3 固定液 (REF A07800) 中重懸細胞團塊。經如此固定的製備品可於 2–8°C 下避光儲存 24 小時。

性能

對於之前採集在無菌試管 (含有 EDTA 鹽作為抗凝劑) 中短於 24 小時的血液檢體，使用上面描述的程序獲取了性能資料。在免疫染色後的 2 小時內進行分析。

準確度

使用了全血和骨髓測定陽性百分比。每份檢體皆使用 2 個批次的 IntraPrep 通透化試劑，以 2 台儀器 1 天執行 2 次，共執行 4 次。使用 Navios 流式細胞分析儀器檢測結果 (陽性%)。根據 CLSI method EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (CLSI 方法 EP5-A2: 評估定量檢測方法的準確度性能) 進行分析。

我們的接受標準視各族群所檢測的陽性事件數量而定：

- 若陽性事件數量 < 1,500，則 CV < 15%
- 若陽性事件數量 > 1,500，則 CV < 10%

EDTA 全血：

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球純度							
陽性事件數量 (平均值) = 8877							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	2.29	1.82	6.47	2.25	1.65	5.82	7.09
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球回收率							
陽性事件數量 (平均值) = 8877							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	0.40	1.00	0.81	0.39	0.25	0.65	1.34
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 單核細胞細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 1070							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.24	2.37	4.37	1.18	1.19	4.01	5.10
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 顆粒性白血球細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 13246							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	0.09	0.03	0.16	0.04	0.03	0.12	0.16
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

肝素全血：

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球純度							
陽性事件數量 (平均值) = 6824							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.33	1.17	2.74	1.65	1.66	1.73	3.40
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球回收率							
陽性事件數量 (平均值) = 6824							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	2.92	2.40	3.01	0.55	0.64	0.34	3.89
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 單核細胞細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 961							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	2.02	0.96	5.17	2.32	3.74	2.94	5.74
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 顆粒性白血球細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 20742							

	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.09	1.10	2.46	1.03	1.08	1.92	2.89
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ACD 全血：

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球純度							
陽性事件數量 (平均值) = 12355							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.91	1.60	3.54	1.55	1.35	2.65	4.18
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球回收率							
陽性事件數量 (平均值) = 12355							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	0.33	0.35	1.06	0.31	0.33	0.95	1.16
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 單核細胞細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 1483							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.52	1.27	4.80	1.18	1.51	4.30	5.11
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 顆粒性白血球細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 32715							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	0.97	0.85	2.83	0.88	0.79	2.54	3.08
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EDTA 骨髓：

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球純度							
陽性事件數量 (平均值) = 8808							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.16	0.89	2.98	0.72	2.32	1.46	3.19
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 細胞膜染色 = 淋巴球回收率							
陽性事件數量 (平均值) = 8808							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	0.37	0.61	1.34	0.31	0.90	0.92	1.50
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 單核細胞細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 2212							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	1.97	1.00	4.11	1.00	1.06	3.44	4.34
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

抗體過氧化酶-FITC 顆粒性白血球細胞漿內染色							
陽性事件數量 (平均值) = 33181							
	各操作者間	各台細胞分析儀器間	批內	批間	各次執行間	各次執行內	總計
CV (%)	0.11	0.29	0.37	0.10	0.13	0.33	0.48
結果	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

淋巴球純度與回收率

已根據 CDC 的建議來計算淋巴球的純度與回收率 (5)。10 名健康捐贈者的血液 (採樣時添加 EDTA、肝素和 ACD)，其中 5 份骨髓使用單株抗體 CD45-FITC 和 CD14-PE 的混合物來標示。回收率和純度以及範圍的均值如下表所示：

EDTA 全血		
參數	回收率	純度
平均值	93.6	89.7
最小/最大	86.1 / 97.6	83.5 / 95.5

肝素全血		
參數	回收率	純度
平均值	94.3	87.6
最小/最大	84.9 / 97.7	81.5 / 94.3

ACD 全血		
參數	回收率	純度
平均值	94.2	94.6
最小/最大	91.1 / 98.5	87.6 / 97.7

EDTA 骨髓		
參數	回收率	純度
平均值	80.7	71.8
最小/最大	78.3 / 85.8	60.1 / 83.4

限制條件

1. 流式細胞分析儀器在下列情況下可能產生錯誤結果：細胞分析儀器未正確校正、螢光洩漏未正確補償、相關區域並未仔細定位。
2. 某些抗原決定簇可能對甲醛或皂素敏感。每個實驗室都必須驗證使用單株抗體的條件。
3. 按照技術手冊採用相關流程並遵循優良實驗室操作規範，便可得到準確且可重複的結果。
4. 該試劑已經過優化，以提供最佳的特異性訊號/非特異性訊號比率。因此，在每次檢測中都務必遵從此試劑體積/白血球及紅血球數量比率。
5. 如果細胞過多，請在 PBS 中稀釋標本，以使白血球少於 5×10^9 個/L，且紅血球少於 6×10^{12} 個/L (6)。
6. 在嚴重腎衰竭、血色素病變等特定疾病狀態中，紅血球溶解可能會變得緩慢、不完全，甚至無法溶解。在這種情況下，建議在染色前使用密度梯度（例如聚蔗糖）分離單核球 (7)。

請參閱附錄以閱讀舉例和參考文獻。

商標

Beckman Coulter、徽標以及本文述及的貝克曼庫爾特公司產品和服務標記是美國貝克曼庫爾特有限公司在美國和其他國家的商標或註冊商標。

其他資訊

對於患者/使用者/第三方（在歐盟和有相同監管制度（體外診斷醫療裝置法規，2017/746/EU）的國家）；如果在使用中或由於使用而導致嚴重事件，請將情況回報製造商和/或授權代表，以及貴國主管機關。

修訂歷程記錄

修訂版 AF：	版本日期：2021 年 1 月
修訂版 AW：	
更新以遵守貝克曼庫爾特公司全球標籤政策以及 IVD-R (EU)2017/746 規定：	
已新增部分	預期使用者、精確度、淋巴球純度與回收率、其他資訊、修訂歷史
已新增資訊	請參閱「警告和預防措施」、「存儲和穩定性」、「限制」等小節
已更新部分	警告和預防措施、GHS 危害分類、存儲和穩定性、變質的證據、程序、性能
已移除的部分	實驗室內的再現性

符號釋義

符號術語表請參見網站：beckman.com/techdocs（文件編號 B60062）

	Reactiv 1	Reactiv 2
	Agent de fixare	Agent de permeabilitate
Formulă	Lichidă	Lichidă
Substanță activă	Formaldehidă	Saponină
Volum	5 ml	5 ml
Număr de flacoane	3 flacoane	3 flacoane
Volum per test	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 de teste; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml/test

Pentru diagnosticare *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

IntraPrep este format din doi reactivi gata de utilizare, care induc permeabilitate în membrana citoplasmatică a leucocitelor pentru demonstrarea determinantilor antigenici intracelulari prin intermediul anticorpilor monoclonali fluorescenți. IntraPrep se utilizează pentru prepararea probelor biologice pentru analiza prin citometrie de flux. Acesta a fost optimizat pentru a minimiza colorarea nespecifică în acest tip de analiză (1,2,3,4).

PRINCIPIU

Într-o primă etapă, celulele sunt fixate folosindu-se reactivul 1. După spălare, se folosește reactivul 2 pentru introducerea permeabilității, iar eritrocitele rămase sunt lizate. În această etapă, celulele sunt aduse în contact cu anticorpi monoclonali conjugați specifici pentru determinanții antigenici intracelulari. Apoi, leucocitele sunt analizate prin citometrie de flux.

Cu toate acestea, demonstrarea determinantilor antigenici de suprafață rămâne posibilă. În acest caz, anticorpii monoclonali conjugați specifici sunt incubati înainte de fixare.

Citometrul în flux măsoară difuzia luminii și fluorescența celulelor. Acesta face posibilă localizarea 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 histogramme 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.

UTILIZATOR PRECONIZAT

Acest produs este destinat utilizării profesionale în laborator.

PROBE

Probele de sânge venos sau măduvă osoasă trebuie prelevate în eprubete sterile conținând o sare EDTA, ACD sau heparină ca anticoagulant.

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

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

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

1. Nu utilizați reactivul după data expirării.
2. Nu congelați.
3. Reduceți la minimum expunerea la lumină.
4. Evitați contaminarea microbiană a reactivilor. În caz contrar, se pot obține rezultate false.
5. Reactivul 1 conține formaldehidă. Formaldehida este toxică și alergenă. De asemenea, este considerată a fi un agent cancerigen.
6. Reactivul 2 conține azidă de sodiu (NaN₃). Acesta trebuie manipulat 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 pentru sânge și materialele de unică folosință utilizate pentru manipulare trebuie eliminate în recipiente ad-hoc destinate incinerării.

10. Reactivii și deșeurile trebuie eliminați în conformitate cu cerințele locale.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Reactiv 1: fixare

PERICOL



H302

Nociv în caz de înghițire.

H313

Poate fi nociv în contact cu pielea

H314

Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor.

H317

Poate produce o reacție alergică la nivelul pielii.

H341

Susceptibil de a cauza malformații genetice.

H350

Poate cauza cancer.

H370

Provoacă leziuni ale organelor.

P201

Obțineți instrucțiuni speciale înainte de utilizare.

P280

Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.

P303+P361+P353

ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau părul): Clățiți pielea cu apă.

P305+P351+P338

ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clățiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clățiți.

P310

Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic.

Metanol 1 - 2%

Formaldehidă 5 - 10%



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

DEPOZITAREA ȘI STABILITATEA

IntraPrep se depozitează la 18–25°C.

Stabilitatea fiolei sigilate: reactivul este stabil timp de 517 (de) zile.

Stabilitatea fiolei desigilate: reactivul este stabil timp de 90 (de) zile.

Consultați certificatul de analiză specific lotului la adresa www.beckman.com.

DOVADĂ DE DETERIORARE

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

Pentru informații suplimentare sau dacă s-a primit un produs deteriorat, sunați la Serviciul Clienți Beckman Coulter la 800-742-2345 (SUA sau Canada) sau contactați-vă reprezentantul Beckman Coulter local.

CONȚINUT

Azida de sodiu folosită drept conservant poate forma compuși cu risc de explozie în conductele de drenaj metalice. Consultați buletinul informativ al NIOSH: Explosive Azide Hazard (Azidă cu risc de explozie) (08/16/76).

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

MATERIALE NECESARE, DAR NEFURNIZATE CU SETUL:

- Eprubete pentru probe și materiale necesare pentru prelevarea probelor.
- Pipete automate cu vârful de unică folosință pentru 10, 20, 50, 100 și 500 μl.
- Eprubete din plastic pentru hemoliză.

- Anticorpi monoclonali specifici (mAb).
- Controale negative.
- Reactiv de fixare a leucocitelor. De exemplu: Soluție de fixare IOTest 3 (ref. A07800).
- Soluție tampon (PBS: 0,01 mol de fosfat de sodiu; 0,145 mol de clorură de sodiu; pH 7,2).
- Centrifugați.
- Agitator automat (tip Vortex).
- Citometru de flux.

PROCEDURĂ

A - Colorare intracitoplasmatică

Numărul de globule roșii prezente în eșantion trebuie să fie mai mic de 6×10^6 per μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Dacă este necesar, diluați în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS).

Numărul de leucocite prezente în eșantion trebuie să fie mai mic de $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Dacă este necesar, diluați în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS).

Pentru fiecare probă analizată se poate adăuga, pe lângă eprubeta de testare, o eprubetă de control în care celulele sunt amestecate în prezența controlului negativ corespunzător colorării specifice selectate.

1. Adăugați 50 μl de probă pentru testare în fiecare eprubetă.
2. Adăugați 100 μl de reactiv 1 în fiecare eprubetă. Omogenizați viguros în vortex imediat după fiecare adăugare.
3. Incubați timp de 15 minute la temperatura camerei (18–25°C).
4. Adăugați 4 ml de PBS în fiecare eprubetă.
5. Centrifugați timp de 5 minute la 300 x g la temperatura camerei.
6. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
7. Adăugați 100 μl de reactiv 2 în fiecare eprubetă. NU OMOGENIZAȚI ÎN VORTEX; permiteți reactivului 2 să se difuzeze în mod natural în peleta de celule.
8. Incubați timp de 5 minute la temperatura camerei (18–25°C) ÎNAINTE DE SCUTURARE.
9. Scuturați cu atenție, de mână, timp de 2 până la 3 secunde.
10. Adăugați cantitatea necesară de mAb (specifică pentru un determinant antigenic intracitoplasmatic) în fiecare eprubetă de testare și, dacă este necesar, cantitatea corespunzătoare de control negativ în fiecare eprubetă de control.
11. Omogenizați eprubetă cu eprubetă în agitator.
12. Incubați timp de 15 minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
13. Adăugați 4 ml de PBS în fiecare eprubetă.
14. Centrifugați timp de 5 minute la 300 x g la temperatura camerei.
15. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și suspendați din nou peleta de celule în 0,5 sau 1 ml de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația sa normală (1X). După această fixare, preparatele pot fi păstrate între 2 și 8°C, ferite de lumină, timp de 24 de ore.

B - Colorare intracitoplasmică și membranoasă

Numărul de globule roșii prezente în eșantion trebuie să fie mai mic de 6×10^6 per μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Dacă este necesar, diluați cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS).

Numărul de leucocite din eșantion trebuie să fie mai mic de $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Dacă este necesar, diluați cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS).

Pentru fiecare probă analizată se poate adăuga, pe lângă eprubeta de testare, o eprubetă de control în care celulele sunt amestecate în prezența controlului negativ corespunzător colorării specifice selectate.

1. Adăugați 50 μl de probă pentru testare în fiecare eprubetă.
2. Adăugați cantitatea necesară de mAb (specifică pentru un determinant antigenic membranos) în fiecare eprubetă de testare și, dacă este necesar, adăugați cantitatea corespunzătoare de control negativ în fiecare eprubetă de control.
3. Omogenizați eprubetă cu eprubetă în agitator.
4. Incubați timp de 15 minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
5. Adăugați 100 μl de reactiv 1 în fiecare eprubetă. Omogenizați viguros în vortex imediat după fiecare adăugare.
6. Incubați timp de 15 minute la temperatura camerei (18–25°C).
7. Adăugați 4 ml de PBS în fiecare eprubetă.

8. Centrifugați timp de 5 minute la 300 x g la temperatura camerei.
9. Îndepărtați supernatantul prin aspirare.
10. Adăugați 100 µl de reactiv 2 în fiecare eprubetă. NU OMOGENIZAȚI ÎN VORTEX; permiteți reactivului 2 să se difuzeze în mod natural în peleta de celule.
11. Incubați timp de 5 minute la temperatura camerei (18–25°C) ÎNAINTE DE SCUTURARE.
12. Scuturați cu atenție, de mână, timp de 2 până la 3 secunde.
13. Adăugați cantitatea necesară de mAb (specifică pentru un determinant antigenic intracitoplasmatic) în fiecare eprubetă de testare și, dacă este necesar, cantitatea corespunzătoare de control negativ în fiecare eprubetă de control.
14. La fiecare eprubetă de control adăugați 20 µl de ser de control izotipic.
15. Omogenizați eprubetă cu eprubetă în agitator.
16. Incubați timp de 15 minute la temperatura camerei (18–25°C) într-un loc ferit de lumină.
17. Adăugați 4 ml de PBS în fiecare eprubetă.
18. Centrifugați timp de 5 minute la 300 x g la temperatura camerei.
19. Îndepărtați supernatantul prin aspirare și suspendați din nou peleta de celule în 0,5 sau 1 ml de soluție de fixare IOTest 3 (REF A07800) la concentrația sa normală (1X). După această fixare, preparatele pot fi păstrate la temperaturi cuprinse între 2 și 8°C și ferite de lumină, timp de 24 de ore.

PERFORMANȚĂ

Datele de performanță se obțin folosindu-se procedeul descris mai sus pe probe de sânge cu o vechime mai mică 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.

PRECIZIE

Valorile procentuale pozitive au fost stabilite folosind sânge integral și măduvă osoasă. Fiecare probă a fost analizată de 4 ori, de două ori pe zi timp de 1 zi, pe 2 instrumente, folosind 2 loturi de reactivi de permeabilizare IntraPrep. Măsurătorile (% pozitive) au fost efectuate pe un citometru în flux Navios. Analiza a fost efectuată în conformitate cu metoda CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluarea performanței de precizie a metodelor de măsurare cantitativă).

Criteriile noastre de acceptare depind de numărul de evenimente pozitive măsurate pentru fiecare populație:

- Dacă evenimentul pozitiv < 1500, CV < 15%
- Dacă evenimentul pozitiv > 1500, CV < 10%

EDTA sânge integral:

Colorare membranoasă CD45/CD14 = puritate limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 8877							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare membranoasă CD45/CD14 = recuperare limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 8877							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe monocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 1070							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe granulocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 13246							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

HEPARINĂ sânge integral:

Colorare membranoasă CD45/CD14 = puritate limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 6824							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare membranoasă CD45/CD14 = recuperare limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 6824							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe monocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 961							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe granulocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 20742							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ACD sânge integral:

Colorare membranoasă CD45/CD14 = puritate limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 12355							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare membranoasă CD45/CD14 = recuperare limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 12355							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe monocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 1483							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe granulocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 32715							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EDTA măduvă osoasă:

Colorare membranoasă CD45/CD14 = puritate limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 8808							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare membranoasă CD45/CD14 = recuperare limfocitară							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 8808							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe monocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 2212							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Colorare intracitoplasmatică anti-mieloperoxidază-FITC pe granulocite							
Număr de evenimente pozitive (medie) = 33181							
	Inter-operator	Inter-citometru	Intra-lot	Inter-lot	Inter-ciclu	Intra-testare	Total
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
REZULTATE	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

PURITATE ȘI RECUPERARE LIMFOCITARĂ

Puritatea și recuperarea limfocitară au fost evaluate în conformitate cu recomandările CDC (5). Sângele de la 10 donatori sănătoși eșantionat în EDTA, heparină și ACD și 5 măduve osoase au fost etichetate cu un amestec de anticorpi monoclonali CD45-FITC și CD14-PE. Valorile medii ale recuperării și purității, precum și intervalul, sunt specificate în tabelele următoare:

EDTA sânge integral		
Parametru	Recuperare	Puritate
Medie	93,6	89,7
Min./Max.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

HEPARINĂ sânge integral		
Parametru	Recuperare	Puritate
Medie	94,3	87,6
Min./Max.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

ACD sânge integral		
Parametru	Recuperare	Puritate
Medie	94,2	94,6
Min./Max.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

EDTA măduvă osoasă		
Parametru	Recuperare	Puritate
Medie	80,7	71,8
Min./Max.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

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. Anumiți determinanți antigenici pot fi sensibili la formaldehidă sau la saponină. Fiecare laborator trebuie să valideze condițiile de utilizare a anticorpilor monoclonali.
3. Se vor obține rezultate corecte și reproductibile dacă procedurile utilizate respectă prospectul tehnic și bunele practici de laborator.
4. Acest reactiv a fost optimizat, astfel încât să ofere cel mai bun raport între semnalul specific și semnalul non-specific. Prin urmare, este important să se respecte raportul dintre volumul de reactiv și numărul de leucocite și eritrocite în fiecare test.
5. În cazul hipercelularității, diluați specimenul în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) astfel încât să se obțină mai puțin de 5×10^9 leucocite/l și mai puțin de 6×10^{12} globule roșii/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 mononucleate 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.

INFORMAȚII SUPLIMENTARE

În cazul unui pacient/utilizator/terț aflat în Uniunea Europeană sau în țări cu un regim de reglementare identic (Regulamentul 2017/746/UE privind dispozitivele medicale pentru diagnostic in vitro); dacă, în timpul utilizării acestui dispozitiv sau în urma utilizării acestuia, are loc un incident grav, raportați acest incident către producător și/sau reprezentantul său autorizat și către autoritatea națională din țara dvs.

ISTORICUL REVIZUIRILOR

REVIZIA AF:	Data publicării: Ianuarie 2021
REVIZIA AW:	
Se actualizează pentru a respecta politica globală de etichetare Beckman Coulter și cerințele regulamentului IVD-R (UE) 2017/746:	
Secțiuni adăugate	Utilizator propus, Precizie, Recuperare și puritate limfocitară, Informații suplimentare, Istoricul revizuirilor
Informații adăugate	Consultați secțiunile Avertizări și măsuri de precauție, Depozitare și stabilitate, Limitări
Secțiuni actualizate	Avertizări și măsuri de precauție, Clasificarea riscurilor în sistemul GHS, Depozitare și stabilitate, Dovadă de deteriorare, Procedură, Performanță
Secțiuni eliminate	Reproductibilitate intralaborator

Cheie simboluri

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

	Reagent 1	Reagent 2
	Fiksirno sredstvo	Sredstvo za permeabilnost
Formulacija	Tekočina	Tekočina
Učinkovina	Formaldehid	Saponin
Količina	5 ml	5 ml
Število vial	3 vial	3 vial
Volumen na test	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 Missing translation for glossary ID 137326 (150 tests; 6 x 5 mL
2 x 0.1 mL / test)

Za diagnostično uporabo *in vitro*

NAMEN UPORABE

Reagent IntraPrep vsebuje dva reagenti, pripravljena za uporabo, ki sprožata permeabilnost v citoplazemski membrani levkocitov, kar omogoča določanje znotrajceličnih antigenskih determinant z monoklonskimi fluorescenčnimi protitelesi. Reagent IntraPrep se uporablja za pripravo bioloških vzorcev za analizo s pretočno citometrijo. Optimiziran je bil za zmanjšanje nespecifičnega barvanja pri tej vrsti analize (1,2,3,4).

NAČELO

Pri prvem koraku se celice fiksirajo z reagentom 1. Po izpiranju se permeabilnost sproži z reagentom 2, preostali eritrociti pa se lizirajo. Med to fazo celice pridejo v stik s konjugiranimi monoklonskimi protitelesi, specifičnimi za znotrajcelične antigenske determinante. Levkociti se nato analizirajo glede na pretočno citometrijo.

Prikaz površinskih antigenskih determinant kljub temu ostaja mogoč. V tem primeru se pred fiksacijo inkubirajo specifična konjugirana monoklonska protitelesa.

Pretočni citometer meri difuzijo svetlobe in fluorescenco celic. Omogoča lokalizacijo opazovane populacije v elektronskem oknu, opredeljenem v histogramu, ki je povezan z ortogonalno difuzijo svetlobe (stransko sipanje ali SS) in difuzijo svetlobe pri majhnemu kotu (sipanje naprej ali FS). Glede na uporabo, ki jo izbere uporabnik, lahko druge histograme, ki uporabljajo kombinacijo dveh različnih parametrov, ki so na voljo na citometru, uporabimo kot nosilce v fazi uokvirjanja.

Fluorescenco razmejenih celic analiziramo z namenom razlikovanja med pozitivno obarvanimi dogodki in tistimi, ki niso obarvani. Rezultati so izraženi kot odstotek pozitivnih dogodkov glede na vse dogodke, pridobljene z uokviranjem.

PREDVIDENI UPORABNIK

Izdelek je namenjen profesionalni laboratorijski uporabi.

VZORCI

Pri odvzemanju vzorcev venske krvi ali kostnega mozga je treba uporabiti sterilne epruvete, ki vsebujejo sol EDTA ali ACD ali heparin kot antikoagulant.

Vzorci je treba hraniti pri sobni temperaturi (18–25 °C) in se jih ne sme pretresati. Vzorec je treba homogenizirati z rahlim stresanjem pred odvzemom testnega vzorca.

Vzorci je treba analizirati v 24 urah po venepunkciji.

OPOZORILA IN PREVIDNOSTNI UKREPI

1. Ne uporabljajte reagenti po izteku roka uporabnosti.
2. Ne zamrzujte.
3. Čim manj izpostavljajte svetlobi.
4. Preprečite mikrobo kontaminacijo reagentov, sicer lahko pride do napačnih rezultatov.
5. Reagent 1 vsebuje formaldehid. Formaldehid je strupen in alergen. Šteje za kancerogeno sredstvo.
6. Reagent 2 vsebuje natrijev azid (NaN₃). Z njim je treba ravnati previdno. Ne zaužijte in se izogibajte vsakršnemu stiku s kožo, sluznico in očmi. Poleg tega lahko natrijev azid v kislem mediju tvori potencialno nevaren vodikov azid. Če ga je treba odstraniti, je reagent priporočljivo razredčiti z veliko količino vode pred izlivanjem v kanalizacijo, da bi se izognili kopičenju natrijevega azida v kovinskih ceveh in preprečili nevarnost eksplozije.
7. Vse vzorce krvi je treba obravnavati kot potencialno kužne in je treba z njimi ravnati previdno (predvsem je treba nositi zaščitne rokavice, halje in očala).

8. Nikoli ne pipetirajte z usti in se izogibajte vsakršnemu stiku vzorcev s kožo, sluznico in očmi.
9. Epruvete za kri in material za enkratno uporabo je treba odstraniti v zabojnike na licu mesta, namenjene sežigu.
10. Reagente in odpadke je treba odstraniti skladno z lokalnimi predpisi.

KLASIFIKACIJA NEVARNOSTI PO GHS

Reagent 1: fiksacija

NEVARNO



H302	Zdravju škodljivo pri zaužitju.
H313	Izdelek je lahko škodljiv ob stiku s kožo.
H314	Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči.
H317	Lahko povzroči alergijski odziv kože.
H341	Sum povzročitve genetskih okvar.
H350	Lahko povzroči raka.
H370	Škoduje organom.
P201	Pred uporabo pridobiti posebna navodila.
P280	Nositi zaščitne rokavice, zaščitno obleko in zaščito za oči/zaščito za obraz.
P303+P361+P353	PRI STIKU S KOŽO (ali lasmi): kožo izprati z vodo.
P305+P351+P338	PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.
P310	Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika. Metanol 1 - 2 % Formaldehid 5 - 10 %



Varnostni list je na voljo na spletnem mestu beckman.com/techdocs

SHRANJEVANJE IN OBSTOJNOST

Reagent IntraPrep se shranjuje pri temperaturi 18–25 °C.

Stabilnost zaprte vial: reagent je stabilen 517 dni.

Stabilnost odprte stekleničke: reagent je stabilen 90 dni.

Oglejte si ustrezen certifikat o analizi za izbrano serijo na spletni strani www.beckman.com.

DOKAZ O POSLABŠANJU STANJA

Vsaka sprememba fizičnega videza reagentov lahko kaže na poslabšanje stanja in reagenta ni dovoljeno uporabljati.

Za dodatne informacije ali ob prejemu poškodovanega izdelka pokličite službo za pomoč strankam družbe Beckman Coulter na številko 800-742-2345 (ZDA ali Kanada) ali se obrnite na lokalnega predstavnika podjetja Beckman Coulter.

VSEBINA

Konzervans iz natrijevega azida lahko tvori eksplozivne spojine v kovinskih odvodnih ceveh. Oglejte si NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (16. 8. 76) (Nevarnost eksplozivnih azidov).

Da bi se izognili morebitnemu kopičenju azidnih spojin, po odstranjevanju nerazredčenega reagenta sperite odtočne cevi z vodo. Odstranjevanje natrijevega azida mora biti skladno z ustreznimi lokalnimi predpisi.

POTREBEN MATERIAL, KI NI PRILOŽEN V KOMPLETU:

- Epruvete za vzorčenje in material, potreben za vzorčenje.
- Samodejne pipete s konicami za enkratno uporabo za 10, 20, 50, 100 in 500 µl.
- Plastične epruvete za hemolizo.

- Specifična monoklonska protitelesa (mAb).
- Negativne kontrole.
- Reagent za fiksacijo levkocitov. Na primer: fiksirna raztopina IOTest 3 (Ref. A07800).
- Puffer (PBS: 0,01 M natrijev fosfat; 0,145 M natrijev klorid; pH 7,2).
- Centrifugirajte.
- Samodejni stresalnik (za stresanje).
- Pretočni citometer.

POSTOPEK

A – Intracitoplazemsko barvanje

Število rdečih krvničk v vzorcu mora biti manjše od 6×10^6 na μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Po potrebi razredčite v raztopini PBS.

Število levkocitov v vzorcu mora biti manjše od $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Po potrebi razredčite v raztopini PBS.

Za vsak analizirani vzorec je poleg testne epruvete lahko dodana še ena kontrolna epruveta, v kateri se celice premešajo v prisotnosti negativne kontrole, ki ustreza izbranemu specifičnemu barvanju.

1. V vsako epruveto dodajte 50 μl testnega vzorca.
2. Vsaki epruveti dodajte 100 μl reagenta. Po vsakem dodajanju močno vrtinčite.
3. Inkubirajte 15 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C).
4. V vsako epruveto dodajte 4 ml PBS.
5. Centrifugirajte 5 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi.
6. Supernatant odstranite z aspiracijo.
7. V vsako epruveto dodajte 100 μl reagenta 2. NE VRTINČITE, reagent 2 pustite, da se naravno zlije s celično peletu.
8. Inkubirajte 5 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C), BREZ STRESANJA.
9. Ročno počasi stresajte od 2 do 3 sekunde.
10. Vsaki epruveti dodajte potrebno količino mAb (specifičnih za intracitoplazemsko antigensko determinanto) in po potrebi vsaki kontrolni epruveti dodajte ustrezno količino negativne kontrole.
11. Nežno vrtinčite posamezne epruvete.
12. Inkubirajte ga 15 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C), zaščitene pred svetlobo.
13. V vsako epruveto dodajte 4 ml PBS.
14. Centrifugirajte 5 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi.
15. Supernatant odstranite z aspiracijo in celično usedlino znova suspendirajte z uporabo 0,5 ml ali 1 ml fiksirne raztopine IOTest 3 (ref. A07800) pri njeni delovni koncentraciji (1-kratni). Tako fiksirane pripravke lahko 24 ur hranite pri temperaturi med 2 °C in 8 °C stran od svetlobe.

B – Intracitoplazemsko in membransko barvanje

Število rdečih krvničk v vzorcu mora biti manjše od 6×10^6 na μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Po potrebi razredčite z raztopino PBS.

Število levkocitov v vzorcu mora biti manjše od $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Po potrebi razredčite z raztopino PBS.

Za vsak analizirani vzorec je poleg testne epruvete lahko dodana še ena kontrolna epruveta, v kateri se celice premešajo v prisotnosti negativne kontrole, ki ustreza izbranemu specifičnemu barvanju.

1. V vsako epruveto dodajte 50 μl testnega vzorca.
2. Vsaki epruveti dodamo potrebno količino mAb (specifično za membransko antigensko determinanto) in po potrebi vsaki kontrolni epruveti dodamo ustrezno količino negativne kontrole.
3. Nežno vrtinčite posamezne epruvete.
4. Inkubirajte ga 15 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C), zaščitene pred svetlobo.
5. Vsaki epruveti dodajte 100 μl reagenta. Po vsakem dodajanju močno vrtinčite.
6. Inkubirajte 15 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C).
7. V vsako epruveto dodajte 4 ml PBS.
8. Centrifugirajte 5 minut pri $300 \times g$ na sobni temperaturi.
9. Supernatant odstranite z aspiracijo.
10. V vsako epruveto dodajte 100 μl reagenta 2. NE VRTINČITE, reagent 2 pustite, da se naravno zlije s celično peletu.

11. Inkubirajte 5 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C), BREZ STRESANJA.
12. Ročno počasi stresajte od 2 do 3 sekunde.
13. Vsaki epruveti dodajte potrebno količino mAb (specifičnih za intracitoplazemsko antigensko determinanto) in po potrebi vsaki kontrolni epruveti dodajte ustrezno količino negativne kontrole.
14. Vsaki kontrolni epruveti dodajte 20 µl izotipske kontrole.
15. Nežno vrtničite posamezne epruvete.
16. Inkubirajte ga 15 minut pri sobni temperaturi (18–25 °C), zaščitene pred svetlobo.
17. V vsako epruveto dodajte 4 ml PBS.
18. Centrifugirajte 5 minut pri 300 × g na sobni temperaturi.
19. Supernatant odstranite z aspiracijo in celično usedlino znova suspendirajte z uporabo 0,5 ml ali 1 ml fiksirne raztopine IOtest 3 (ref. A07800) pri njeni delovni koncentraciji (1-kratni). Tako fiksirani pripravki se lahko hranijo pri temperaturi med 2 °C in 8 °C ter 24 ur zunaj svetlobe.

USPEŠNOST

Podatke o zmogljivosti pridobimo z zgoraj opisanim postopkom na vzorcih krvi, starih manj kot 24 ur, ki so bili predhodno zbrani v sterilnih epruvetah s soljo EDTA kot antikoagulantom. Analizo se izvede v 2 urah po imunohistokemičnem barvanju.

NATANČNOST

Odstotke pozitivnih vrednosti smo določili z uporabo polne krvi in kostnega mozga. Vsak vzorec je bil obravnavan štirikrat, dvakrat dnevno en dan na dveh napravah z uporabo dveh serij reagenta za permeabilizacijo IntraPrep. Meritve (% pozitivnih) so bile opravljene na pretočnem citometru Navios. Analiza je bila izvedena na podlagi metode CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Vrednotenje natančnosti kvantitativnih merilnih metod).

Naša merila sprejemljivosti so odvisna od števila pozitivnih dogodkov, izmerjenih za vsako populacijo:

- Če je pozitiven dogodek < 1.500, je CV < 15 %
- Če je pozitiven dogodek > 1.500, je CV < 10 %

EDTA za polno kri:

Membransko barvanje CD45/CD14 = čistost limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 8877							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko barvanje CD45/CD14 = obnovitev limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 8877							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na monocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 1070							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na granulocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 13246							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

HEPARIN za polno kri:

Membransko barvanje CD45/CD14 = čistost limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 6824							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko barvanje CD45/CD14 = obnovitev limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 6824							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na monocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 961							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na granulocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 20742							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ACD za polno kri:

Membransko barvanje CD45/CD14 = čistost limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 12355							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko barvanje CD45/CD14 = obnovitev limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 12355							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na monocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 1483							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na granulocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 32715							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EDTA za kostni mozeg:

Membransko barvanje CD45/CD14 = čistost limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 8808							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Membransko barvanje CD45/CD14 = obnovitev limfocitov							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 8808							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na monocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 2212							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj

CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Intracitoplazemsko barvanje proti mieloperoksidazi-FITC na granulocitih							
Število pozitivnih dogodkov (povprečje) = 33181							
	Med upravljavci	Med citometri	Znotraj serije	Med serijami	Med postopki	Znotraj postopka	Skupaj
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ČISTOST IN OBNOVITEV LIMFOCITOV

Čistost in obnovitev limfocitov sta se ocenila skladno s priporočili centra CDC (5). Kri 10 zdravih darovalcev, odvzeta v EDTA, heparin in ACD, ter 5 vzorcev kostnega mozga so označili z mešanico monoklonskih protiteles CD45-FITC in CD14-PE. Povprečne vrednosti obnovitve in čistosti ter njun razpon so prikazani v naslednjih preglednicah:

EDTA za polno kri		
Parameter	Obnovitev	Čistost
Povprečje	93,6	89,7
Min./maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

HEPARIN za polno kri		
Parameter	Obnovitev	Čistost
Povprečje	94,3	87,6
Min./maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

ACD za polno kri		
Parameter	Obnovitev	Čistost
Povprečje	94,2	94,6
Min./maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

EDTA za kostni mozeg		
Parameter	Obnovitev	Čistost
Povprečje	80,7	71,8
Min./maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

OMEJITVE

1. S pretočno citometrijo lahko pride do napačnih rezultatov, če citometer ni bil točno nameščen, če puščanje fluorescence ni bilo ustrezno izravnano in če območja niso bila natančno pozicionirana.
2. Nekatero antigensko determinante so lahko občutljive za formaldehid ali saponin. Vsak laboratorij mora validirati pogoje uporabe monoklonskih protiteles.
3. Točne in ponovljive rezultate se bo doseglo, če se bo uporabilo postopke, ki so skladni s priloženim tehničnim listom in z načeli dobre laboratorijske prakse.
4. Ta reagent je optimiziran za najboljše razmerje med specifičnim in nespecifičnim signalom. Zato je pomembno pri vsakem testu upoštevati razmerje med volumnom reagenta in številom levkocitov ter eritrocitov.
5. V primeru hipercelularnosti vzorec razredčite v PBS, tako da pridobite manj kot 5×10^9 levkocitov/l in manj kot 6×10^{12} rdečih krvničk/l (6).
6. Pri nekaterih bolezenskih stanjih, kot je huda ledvična odpoved ali hemoglobinopatije, je lahko liza rdečih krvničk počasna, nepopolna ali celo nemogoča. V tem primeru je priporočljivo izolirati mononuklearne celice z uporabo gradienta gostote (na primer Ficoll) pred barvanjem (7).

Primere in reference si oglejte v prilogi.

BLAGOVNE ZNAMKE

Beckman Coulter, stiliziran logotip ter znamke izdelkov in storitev podjetja Beckman Coulter, omenjene v tem dokumentu, so blagovne znamke ali registrirane blagovne znamke podjetja Beckman Coulter, Inc. v Združenih državah Amerike in drugih državah.

DRUGI PODATKI

Za bolnike/uporabnike/tretje osebe v Evropski uniji in v državah z enakim regulativnim režimom (Uredba 2017/746/EU o medicinskih pripomočkih za in vitro diagnostiko): če med uporabo tega pripomočka ali kot rezultat njegove uporabe pride do resnega incidenta, o tem poročajte proizvajalcu in/ali njegovemu pooblaščenemu predstavniku in svojemu nacionalnemu organu.

ZGODOVINA REVIZIJ

REVIDIRANA IZDAJA AF:	Datum izdaje: Januar 2021
REVIDIRANA IZDAJA AW:	
Posodobitve za skladnost z globalno politiko označevanja Beckman Coulter in v skladu z zahtevami IVD-R (EU) 2017/746:	
Dodana poglavja	Predvideni uporabnik, Natančnost, Obnovitev in čistost limfocitov, Druge informacije, Zgodovina revizij
Dodatne informacije	Glejte poglavja Opozorila in previdnostni ukrepi, Shranjevanje in stabilnost, Omejitve
Posodobljena poglavja	Opozorila in previdnostni ukrepi, Razvrstitev glede na nevarnosti skladno z globalnim usklajenim sistemom, Shranjevanje in stabilnost, Dokazi o poslabšanju stanja, Postopek, Delovanje
Odstranjena poglavja	Ponovljivost znotraj laboratorija

Seznam simbolov

Glosar simbolov je na voljo na beckman.com/techdocs (številka dokumenta B60062)

	Reagens 1	Reagens 2
	Sredstvo za fiksiranje	Sredstvo za promenu propusnosti
Formulacija	Tečno	Tečno
Aktivna supstanca	Formaldehid	Saponin
Zapremina	5 ml	5 ml
Broj bočica	3 bočice	3 bočice
Zapremina po testu	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testova; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml / testu

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu

NAMENA

IntraPrep reagens se sastoji od dva pripremljena reagensa, koji indukuju propustljivost u citoplazmatskoj membrani leukocita u cilju demonstracije unutarćelijskih antigenih determinanti pomoću monoklonskih fluorescentnih antitela. IntraPrep se koristi za pripremu bioloških uzoraka za analizu protočnom citometrijom. On je optimizovan kako bi se smanjilo nespecifično bojenje u ovoj vrsti analize (1,2,3,4).

PRINCIP

U prvom koraku ćelije se fiksiraju reagensom 1. Nakon pranja, propusnost se indukuje pomoću reagensa 2 i preostali eritrociti se liziraju. Tokom ove faze ćelije se dovode u kontakt sa konjugovanim monoklonskim antitelima specifičnim za unutarćelijske antigene determinante. Leukociti se zatim analiziraju protočnom citometrijom.

Demonstracija površinskih antigenih determinanti i pored toga ostaje moguća. U tom slučaju, specifična konjugovana monoklonska antitela se inkubiraju pre fiksacije.

Protočni citometar meri difuziju svetlosti i fluorescenciju ćelija. On omogućava lokalizaciju populacije od interesa u okviru elektronskog prozora definisanog na histogramu, što je u korelaciji sa ortogonalnom difuzijom svetlosti (bočno rasejanje ili SS) i difuzijom uskougaone svetlosti (prednje rasejanje ili FS). Drugi histogrami koji kombinuju dva različita parametra koja postoje na citometru mogu se koristiti kao podrška u fazi regulacije, 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.

PREDVIĐENI KORISNIK

Ovaj proizvod je namenjen za stručnu upotrebu u laboratoriji.

UZORCI

Uzorci iz venske krvi ili koštane srži moraju se uzimati sterilnim epruvetama za uzorak koje sadrže EDTA so ili ACD ili heparin kao antikoagulans.

Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi (18–25°C) i ne tresti. Uzorak treba pre uzimanja testnog uzorka homogenizovati blagim mešanjem.

Uzorci se moraju analizirati u roku od 24 sati od venepunkcije.

UPOZORENJE I MERE OPREZA

1. Ne koristite reagense nakon isteka roka trajanja.
2. Ne zamrzavajte.
3. Izbegavati izloženost svetlosti.
4. Sprečite mikrobsku kontaminaciju reagenasa ili se mogu javiti netačni rezultati.
5. Reagens 1 sadrži formaldehid. Formaldehid je otrovan i alergen. Smatra se da je on karcinogeni agens.
6. Reagens 2 sadrži natrijum azid (NaN₃). Njime treba pažljivo rukovati. Ne uzimati interno i izbegavati svaki dodir sa kožom, sluzokožom i očima. Pored toga, u kiseloj sredini, natrijum azid može formirati potencijalno opasnu hidrazoinsku kiselinu. Ako je potrebno da se odloži u otpad, preporučuje se da se reagens razblaži u velikoj zapremini vode pre sipanja u kanalizaciju kako bi se izbeglo taloženje natrijum azida u metalnim cevima i sprečila opasnost od eksplozije.
7. Svi uzorci krvi moraju se smatrati potencijalno infektivnim i njima se mora pažljivo rukovati (posebno: nošenje zaštitnih rukavica, odeće i zaštitnih naočara).
8. Nikada ne pipetirajte ustima i izbegavajte svaki kontakt uzoraka sa kožom, sluzokožom i očima.

9. Epruvete za uzorak krvi i potrošni materijal koji je korišćen za rukovanje treba odložiti u ad hoc kontejnere predviđene za spaljivanje.

10. Reagense i otpad treba ukloniti prema lokalnim zahtevima.

GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

Reagens 1: fiksacija

OPASNOST



H302	Štetno ako se proguta.
H313	Može da bude štetno u dodiru s kožom
H314	Izaziva teške opekotine kože i oštećenje oka.
H317	Može da izazove alergijske reakcije na koži.
H341	Sumnja se da uzrokuje genetske defekte.
H350	Može da izazove kancer.
H370	Uzrokuje oštećenje organa.
P201	Potrebna su posebna uputstva pre upotrebe.
P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.
P303+P361+P353	AKO DOSPE NA KOŽU (ili u kosu): Isprati kožu vodom.
P305+P351+P338	DODIR S OČIMA: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako postoje i ako su lako dostupna. Nastaviti sa ispiranjem.
P310	Odmah pozovite CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili lekara. Metanol 1 - 2% Formaldehid 5 - 10%



Bezbednosni list je dostupan na adresi beckman.com/techdocs

SKLADIŠTENJE I STABILNOST

IntraPrep reagens se čuva na temperaturi od 18 do 25°C.

Stabilnost zatvorene bočice: reagens je stabilan 517 dana.

Stabilnost otvorene bočice: reagens je stabilan 90 dan(a).

Pogledajte dokument „Certificate of Analysis“ (Sertifikat analize) za određeni lot na veb-sajtu www.beckman.com.

DOKAZI POGORŠANJA

Bilo koja promena u fizičkom izgledu reagensa može ukazivati na pogoršanje i reagens ne treba koristiti.

Za dodatne informacije ili ako dobijete oštećen proizvod, pozovite korisnički servis kompanije Beckman Coulter na broj 800-742-2345 (SAD ili Kanada) ili pozovite svog lokalnog predstavnika kompanije Beckman Coulter.

SADRŽAJ

Konzervans sa natrijum azidom može formirati eksplozivna jedinjenja u metalnim odvodnim vodovima. Pogledajte „NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard“ (16.8.76.) (Bilten Nacionalnog instituta za bezbednost i zdravlje na radu: Opasnost od eksplozivnih azida).

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

POTREBNI MATERIJALI KOJI SE NE ISPORUČUJU UZ KOMPLET:

- Epruvete za uzorkovanje i materijal potreban za uzorkovanje.
- Automatske pipete sa nastavcima za jednokratnu upotrebu za 10, 20, 50, 100 i 500 µl.
- Plastične epruvete za hemolizu.

- Specifična monoklonska antitela (mAb).
- Negativne kontrole.
- Reagens za fiksiranje leukocita. Na primer: IOTest 3 fiksativni rastvor (referentni broj A07800).
- Pufer (PBS: 0,01 M natrijum-fosfat; 0,145 M natrijum-hlorid; pH 7,2).
- Centrifuga.
- Automatska mešalica (vrtložnog tipa).
- Protočni citometar.

POSTUPAK

A - Intracitoplazmatsko bojenje

Broj eritrocita koji postoji u uzorku treba da bude manji od 6×10^6 po μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Po potrebi razblažite u PBS-u.

Broj leukocita koji postoji u uzorku treba da bude manji od $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Po potrebi razblažite u PBS-u.

Za svaki analiziran uzorak, pored epruvete za testiranje, može da se doda i jedna kontrolna epruveta za uzorak u kojoj se ćelije mešaju u prisustvu negativne kontrole koja odgovara odabranom specifičnom bojenju.

1. Dodajte 50 μl uzorka za testiranje u svaku epruvetu za uzorak.
2. Dodajte 100 μl reagensa 1 u svaku epruvetu. Jako promešajte odmah nakon svakog dodavanja.
3. Inkubirajte 15 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C).
4. Dodajte 4 ml PBS-a u svaku epruvetu za uzorak.
5. Centrifugirajte 5 minuta na 300 x g, na sobnoj temperaturi.
6. Uklonite supernatant aspiracijom.
7. Dodajte 100 μl reagensa 2 u svaku epruvetu. **NE MEŠAJTE U VRTLOŽNOJ MEŠALICI**, ostavite reagens 2 da se prirodno razlije u talog ćelija.
8. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C) **BEZ TREŠENJA**.
9. Polako tresite rukom 2 do 3 sekunde.
10. Dodajte potrebnu količinu mAt (specifičnu za intracitoplazmični antigenski determinat) u svaku epruvetu za testiranje i po potrebi dodajte odgovarajuću količinu negativne kontrole u svaku kontrolnu epruvetu.
11. Pažljivo izmešajte jednu po jednu epruvetu za uzorak u vrtložnoj mešalici.
12. Inkubirajte 15 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C) zaštićeno od svetlosti.
13. Dodajte 4 ml PBS-a u svaku epruvetu za uzorak.
14. Centrifugirajte 5 minuta na 300 x g, na sobnoj temperaturi.
15. Aspiracijom uklonite supernatant i ponovo suspendujte talog ćelija u 0,5 ili 1 ml IOTest 3 fiksativnog rastvora (REF. A07800) pri njegovoj radnoj koncentraciji (1X). Tako fiksirani, preparati se mogu čuvati na temperaturi od 2 do 8°C van domašaja svetlosti tokom 24 sata.

B - Intracitoplazmatsko i membransko bojenje

Broj eritrocita koji postoji u uzorku treba da bude manji od 6×10^6 po μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Po potrebi razblažite PBS-om.

Broj leukocita u uzorku treba da bude manji od $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Po potrebi razblažite PBS-om.

Za svaki analiziran uzorak, pored epruvete za testiranje, može da se doda i jedna kontrolna epruveta za uzorak u kojoj se ćelije mešaju u prisustvu negativne kontrole koja odgovara odabranom specifičnom bojenju.

1. Dodajte 50 μl uzorka za testiranje u svaku epruvetu za uzorak.
2. Dodajte potrebnu količinu mAt (specifičnu za membranski antigenski determinat) u svaku epruvetu za testiranje i po potrebi dodajte odgovarajuću količinu negativne kontrole u svaku kontrolnu epruvetu.
3. Pažljivo izmešajte jednu po jednu epruvetu za uzorak u vrtložnoj mešalici.
4. Inkubirajte 15 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C) zaštićeno od svetlosti.
5. Dodajte 100 μl reagensa 1 u svaku epruvetu. Jako promešajte odmah nakon svakog dodavanja.
6. Inkubirajte 15 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C).
7. Dodajte 4 ml PBS-a u svaku epruvetu za uzorak.
8. Centrifugirajte 5 minuta na 300 x g, na sobnoj temperaturi.
9. Uklonite supernatant aspiracijom.

10. Dodajte 100 µl reagensa 2 u svaku epruvetu. NE MEŠAJTE U VRTLOŽNOJ MEŠALICI, ostavite reagens 2 da se prirodno razlije u talog ćelija.
11. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C) BEZ TREŠENJA.
12. Polako tresite rukom 2 do 3 sekunde.
13. Dodajte potrebnu količinu mAt (specifičnu za intracitoplazmični antigenski determinant) u svaku epruvetu za testiranje i po potrebi dodajte odgovarajuću količinu negativne kontrole u svaku kontrolnu epruvetu.
14. U svaku kontrolnu epruvetu za uzorak dodajte 20 µl izotipske kontrole.
15. Pažljivo izmešajte jednu po jednu epruvetu za uzorak u vrtložnoj mešalici.
16. Inkubirajte 15 minuta na sobnoj temperaturi (18–25°C) zaštićeno od svetlosti.
17. Dodajte 4 ml PBS-a u svaku epruvetu za uzorak.
18. Centrifugirajte 5 minuta na 300 x g, na sobnoj temperaturi.
19. Aspiracijom uklonite supernatant i ponovo suspendujte talog ćelija u 0,5 ili 1 ml IOTest 3 fiksativnog rastvora (REF. A07800) pri njegovoj radnoj koncentraciji (1X). Tako fiksirani, preparati se mogu čuvati na temperaturi od 2 do 8°C van domašaja svetlosti tokom 24 sata.

PERFORMANSE

Podaci o delovanju dobijeni su pomoću prethodno opisanog postupka na manje od 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.

PRECIZNOST

Procenat pozitivnih vrednosti utvrđen je pomoću pune krvi i koštane srži. Svaki uzorak je analiziran 4 puta, dva puta dnevno tokom 1 dana na 2 instrumenta pomoću 2 lota IntraPrep reagensa propustljivosti. Merenja (% pozitivnog) su izvršena na Navios protočnom citometru. Analiza je obavljena na osnovu CLSI metoda EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluacija preciznog utvrđivanja performansi kvantitativnih metoda merenja).

Naši kriterijumi prihvatljivosti zavise od broja pozitivnih događaja izmerenih za svaku populaciju:

- Ako je pozitivan događaj <1.500, CV <15%
- Ako je pozitivan događaj >1.500, CV <10%

EDTA pune krvi:

CD45/CD14 membranozno bojenje = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 8877							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranozno bojenje = prinos limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 8877							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 1070							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 13246							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

HEPARIN pune krvi:

CD45/CD14 membranozno bojenje = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 6824							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranozno bojenje = prinos limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 6824							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 961							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 20742							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ACD pune krvi:

CD45/CD14 membranozno bojenje = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 12355							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranozno bojenje = prinos limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 12355							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 1483							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 32715							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EDTA koštane srži:

CD45/CD14 membranozno bojenje = čistoća limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 8808							

	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membranozno bojenje = prinos limfocita							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 8808							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na monocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 2212							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mijeloperoksidazno-FITC intracitoplazmično bojenje na granulocitima							
Broj pozitivnih događaja (srednja vrednost) = 33181							
	Između više operatera	Između više citometara	Unutar jednog lota	Između više lotova	Između više analiziranja	Unutar jednog analiziranja	Ukupno
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
REZULTATI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ČISTOĆA I PRINOS LIMFOCITA

Čistoća i prinos limfocita procenjeni su u skladu sa preporukama CDC (5). Uzorci krvi 10 zdravih donora uzeti u EDTA, Heparin i ACD i 5 koštanih srži obeleženi su smešom monoklonalnih antitela CD45-FITC i CD14-PE. Srednje vrednosti prinosa i čistoće, kao i opseg navedeni su u tabelama u nastavku:

EDTA pune krvi		
Parametar	Prinos	Čistoća
Srednja vrednost	93,6	89,7
Min./maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

HEPARIN pune krvi		
Parametar	Prinos	Čistoća
Srednja vrednost	94,3	87,6
Min./maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

ACD pune krvi		
Parametar	Prinos	Čistoća
Srednja vrednost	94,2	94,6
Min./maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

EDTA koštane srži		
Parametar	Prinos	Čistoća
Srednja vrednost	80,7	71,8
Min./maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

OGRANIČENJA

1. Protočna citometrija može proizvesti netačne rezultate ako citometar nije pravilno postavljen, ako fluorescentna curenja nisu ispravno kompenzirana ili ako regioni nisu pažljivo postavljeni.
2. Određene antigene determinante mogu biti osetljive na formaldehid ili na saponin. Svaka laboratorija mora potvrditi uslove za upotrebu monoklonskih antitela.
3. Tačni i ponovljivi rezultati će se dobijati sve dok su korišćeni postupci u skladu sa listom sa tehničkim podacima i postupci kompatibilni sa smernicama dobre laboratorijske prakse.
4. Ovaj reagens je optimizovan tako da ponudi najbolji odnos specifičnog signala i nespecifičnog signala. Prema tome, važno je u svakom testu koristiti utvrđeni odnos zapremine reagensa i broja leukocita i eritrocita.
5. U slučaju hipercelularnosti, razblažite uzorak u PBS-u tako da se dobije manje od 5×10^9 leukocita/l i manje od 6×10^{12} eritrocita/l (6).

6. U određenim stanjima bolesti, kao što su teška bubrežna insuficijencija ili hemoglobinopatije, liziranje eritrocita može biti sporo, nepotpuno ili čak nemoguće. U tom slučaju se pre bojenja preporučuje izoliranje mononuklearnih ćelija upotrebom gradijenta gustine (na primer, ficol) (7).

Za primere i referentne materijale pogledati Dodatak.

ŽIGOVI

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

DODATNE INFORMACIJE

Za pacijenta/korisnika/treću stranu u Evropskoj uniji i zemljama sa identičnim regulatornim režimom (Uredba 2017/746/EU o in vitro dijagnostičkim medicinskim sredstvima); ako je tokom upotrebe ovog uređaja ili kao rezultat njegove upotrebe došlo do ozbiljnog incidenta, prijavite ga proizvođaču i/ili njegovom ovlašćenom predstavniku i svom nacionalnom organu.

ISTORIJA REVIZIJA

REVIZIJA AF:	Datum izdavanja: januar 2021.
REVIZIJA AW:	
Ažurirano radi usklađenosti sa smernicama za globalno obeležavanje kompanije Beckman Coulter u skladu sa zahtevima IVD-R (EU)2017/746:	
Dodati odeljci	Predviđeni korisnik, preciznost, prinos i čistoća limfocita, dodatne informacije, istorija revizija
Dodate informacije	Pogledati odeljke Upozorenje i mere opreza, Skladištenje i stabilnost, Ograničenja
Dopunjeni odeljci	Upozorenje i mere opreza, GHS klasifikacija opasnosti, skladištenje i stabilnost, dokazi pogoršanja, postupak, performanse
Uklonjeni odeljci	Međulaboratorijska reproduktivnost

Ključ za simbole

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

	1. reaģents	2. reaģents
	Fiksācijas aģents	Caurlaidības aģents
Formulēšana	Šķidrums	Šķidrums
Aktīvā viela	Formaldehīds	Saponīns
Tilpums	5 ml	5 ml
Flakonu skaits	3 flakoni	3 flakoni
Tilpums testā	100 µl	100 µl

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testi; 6 x 5 ml
2 x 0,1 ml/testā

In vitro diagnostikas lietošanai

PAREDZĒTĀ LIETOŠANA

IntraPrep sastāv no diviem lietošanai gataviem reaģentiem, kas leikocītu citoplazmas membrānā izraisa caurlaidību, lai uzrādītu intracelulāros epitopus, izmantojot monoklonālās fluorescējošās antivielas. IntraPrep tiek izmantots, lai sagatavotu bioloģiskos paraugus analizēšanai, izmantojot plūsmas citometriju. Tas ir optimizēts, lai šī tipa analizēs (1,2,3,4) minimizētu nespecifisko iekrāsošanu.

PRINCIPS

Vispirms šūnas tiek fiksētas ar reaģentu 1. Pēc mazgāšanas caurlaidība tiek izraisīta ar reaģentu 2 un atlikušie eritrocīti tiek lizēti. Šajā posmā šūnām liek saskarties ar konjugētām monoklonālajām antivielām, kuras ir raksturīgas intracelulārajām antigēna determinantēm. Pēc tam tiek veikta leikocītu analīze ar plūsmas citometriju.

Tomēr virsmas antigēnu noteikšana joprojām ir iespējama. Tādā gadījumā specifiskās konjugētās monoklonālās antivielas tiek inkubētas pirms fiksācijas.

Plūsmas citometrs mēra gaismas difūziju un šūnu fluorescenci. Tādēļ ir iespējama interesējošās populācijas lokalizēšana elektroniskajā logā, kas definēts histogrammā, kura korelē ar gaismas ortogonālo difūziju (sānu izkliedi jeb SS (Side Scatter)) un šaurleņķa gaismas difūziju (priekšējo izkliedi jeb FS (Forward Scatter)). Kā papildu metodes sinhronizācijas procesā iespējams izmantot citas histogrammas, kurās iespējams kombinēt divus dažādus citometrā pieejamos parametrus atkarībā no lietotāja izvēlētā izmantojuma.

Tiek analizēta atdalīto šūnu fluorescences, lai atšķirtu pozitīvi iekrāsotus notikumus no neiekrāsotajiem. Rezultāti tiek izteikti kā procentuālais lielums no pozitīviem notikumiem attiecībā pret visiem notikumiem, kas iegūti selekcijā.

PAREDZĒTAIS LIETOTĀJS

Šis produkts ir paredzēts profesionālai lietošanai laboratorijā.

PARAUGI

Lai paņemtu venozo asiņu vai kaulu smadzeņu paraugus, ir jāizmanto sterili stobriņi, kuros ir EDTA sāls, ACD vai heparīns, kas darbojas kā antikoagulants.

Paraugi ir jāuzglabā istabas temperatūrā (18–25 °C), un tos nedrīkst sakratīt. Pirms testa parauga ņemšanas ir jāveic parauga homogenizācija, viegli saskalinot paraugu.

Paraugu analīze ir jāveic 24 stundu laikā pēc vēnas punkcijas.

BRĪDINĀJUMI UN PIESARDZĪBAS PASĀKUMI

1. Neizmantojiet reaģentu pēc derīguma termiņa beigām.
2. Nedrīkst sasaldēt.
3. Minimizējiet ekspozīciju gaismas iedarbībai.
4. Izvairieties no reaģentu bakteriālas kontaminācijas, jo iespējami viltus rezultāti.
5. Reaģents 1 satur formaldehīdu. Formaldehīds ir toksisks un alergēns. Tas tiek uzskatīts par kancerogēnu vielu.
6. Reaģents 2 satur Nātrija azīds (NaN₃). Ar to ir jārīkojas uzmanīgi. Neizmantojiet iekšķīgi un nepieļaujiet saskari ar ādu, gļotādu un acīm. Skābā vidē nātrija azīds var radīt potenciāli bīstamu hidrazoīdskābi. Ja to nepieciešams utilizēt, reaģentu ieteicams šķīdināt lielā daudzumā ūdens un izliet to kanalizācijas sistēmā, lai novērstu nātrija azīda uzkrāšanos metāla caurulēs un novērstu sprādziena risku.
7. Visi asins paraugi ir jāuzskata par potenciāli infekcioziem, un ar tiem jārīkojas, ievērojot piesardzību (respektīvi, jāvalkā aizsargcimdi, aizsargtērpi un brilles).
8. Nekādā gadījumā neizmantojiet muti, lai darbotos ar pipeti. Paraugi nekādā gadījumā nedrīkst saskarties ar ādu, gļotādu un acīm.
9. Darbā izmantotās asiņu mēģenes un vienreizlietojamie materiāli ir jāizmet ad hoc konteineros, kas paredzēti sadedzināšanai.

10. Ir jāveic reaģentu un atkritumu utilizācija atbilstoši vietējām prasībām.

ĶĪMISKO VIELU KLASIFICĒŠANAS UN MARĶĒŠANAS VISPĀRĒJI SASKAŅOTĀS SISTĒMAS BĪSTAMĪBAS KLASIFIKĀCIJA

1. reaģents: fiksācija

BĪSTAMI



H302	Kaitīgs, ja norij.
H313	Var būt kaitīgs, ja nonāk saskarē ar ādu.
H314	Izraisa smagus ādas apdegumus un acu bojājumus.
H317	Var izraisīt alerģisku ādas reakciju.
H341	Ir aizdomas, ka var izraisīt ģenētiskus bojājumus.
H350	Var izraisīt vēzi.
H370	Rada orgānu bojājumus.
P201	Pirms lietošanas saņemiet speciālas instrukcijas.
P280	Izmantojiet aizsargcimdus, aizsargapģērbu un acu aizsargus/sejas aizsargus.
P303+P361+P353	SASKARĒ AR ĀDU (vai matiem): Noskalot ādu ar ūdeni.
P305+P351+P338	IEKĻŪSTOT ACĪS: Uzmanīgi izskalot ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemt kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to ir viegli izdarīt. Turpināt skalot.
P310	Nekavējoties sazinieties ar SAINDĒŠANĀS CENTRU vai ārstu. Metanols 1 - 2 % Formaldehīds 5 - 10 %



Drošības datu lapa ir pieejama vietnē: techdocs.beckman.com

GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

IntraPrep ir jāglabā 18–25 °C temperatūrā.

Aizvērta flakona stabilitāte: reaģents ir stabils 517 dienas.

Atvērta flakona stabilitāte: reaģents ir stabils 90 dienas.

Konkrētai partijai atbilstošo analīzes sertifikātu skatiet vietnē www.beckman.com.

SADALĪŠANĀS PAZĪMES

Jebkuras reaģentu pazīmju izmaiņas var norādīt, ka reaģents sadalās un to nedrīkst izmantot.

Lai iegūtu papildu informāciju vai arī ja saņemtais izstrādājums ir bojāts, zvaniet Beckman Coulter klientu servisam pa tālruni 800-742-2345 (ASV vai Kanāda) vai sazinieties ar vietējo Beckman Coulter pārstāvi.

SATURS

Nātrija azīda konservants var izveidot sprādzienbīstamus savienojumus metāla notekcaurulēs. Skatīt NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (NIOSH biļetens: Azīdu sprādzienbīstamība) (16.8.76.).

Lai nepieļautu iespējamo azīda savienojumu uzkrāšanos, pēc neatšķaidītā reaģenta izmešanas izskalojiet kanalizācijas caurules ar ūdeni. Nātrija azīda izmešana ir jāveic saskaņā ar atbilstošajiem vietējiem noteikumiem.

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NEIETILPST KOMPLEKTĀ

- Paraugu ņemšanai nepieciešamās mēģenes un materiāli.
- Automātiskās pipetes ar vienreizlietojamiem uzgājiem, kas paredzētas 10, 20, 50, 100 un 500 µl.
- Plastmasas hemolīzes mēģenes.
- Specifiskās monoklonālās antivielas (mAb).
- Negatīvās kontroles.
- Leikocītu fiksācijas reaģents. Piemērs: IOTest 3 fiksatīvais šķīdums (ats. A07800).

- Buferšķīdums (PBS: 0,01 M nātrija fosfāta; 0,145 M nātrija hlorīda; pH 7,2).
- Centrifugējiet.
- Automātisks maisītājs (samaisīšanas tipa).
- Plūsmas citometrs.

RĪCĪBA

A — intracitoplazmas iekrāsošana

Paraugā esošo sarkano asinsķermenīšu skaitam ir jābūt mazākam nekā 6×10^6 uz μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Ja nepieciešams, atšķaidiet ar PBS.

Paraugā esošo leikocītu skaitam ir jābūt mazākam nekā $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Ja nepieciešams, atšķaidiet ar PBS.

Katram analizētajam paraugam papildus testa mēģenei var pievienot vienu kontroles mēģeni, kurā šūnas tiek sajauktas ar negatīvo kontroli atbilstoši konkrētajai izvēlētajai iekrāsošanai.

1. Pievienojiet 50 μl testa parauga katrai mēģenei.
2. Katrai mēģenei pievienojiet 100 μl reaģenta 1. Uzreiz pēc katras pievienošanas enerģiski samaisiet.
3. Inkubējiet 15 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C).
4. Katrā mēģenē pievienojiet 4 ml PBS.
5. Centrifugējiet 5 minūtes istabas temperatūrā, izmantojot 300 x g.
6. Aspirējot noņemiet virsējo slāni.
7. Katrai mēģenei pievienojiet 100 μl reaģenta 2. NESAMAISIET, ļaujiet reaģentam 2 dabīgi izšķīst šūnu lodītē.
8. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C) BEZ KRATĪŠANAS.
9. Ar roku lēni sakratiet 2–3 sekundes.
10. Katrai testa mēģenei pievienojiet nepieciešamo mAb (specifisks intracitoplazmiskā antigēna determinantam) daudzumu un, ja nepieciešams, katrai kontroles mēģenei pievienojiet atbilstošu daudzumu negatīvās kontroles.
11. Saudzīgi saskaliniet katru stobriņu.
12. Inkubējiet vismaz 15 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C), sargājot no gaismas.
13. Katrā mēģenē pievienojiet 4 ml PBS.
14. Centrifugējiet 5 minūtes istabas temperatūrā, izmantojot 300 x g.
15. Aspirējot noņemiet virsējo slāni un šūnu centrifugātu atkārtoti suspendējiet 0,5–1 ml IOTest 3 fiksējošajā šķīdumā (REF A07800) darba koncentrācijā (1X). Šādi fiksētas sagataves 2–8 °C temperatūrā, sargājot no gaismas, var glabāt 24 stundas.

B — intracitoplazmas un membrānas iekrāsošana

Paraugā esošo sarkano asinsķermenīšu skaitam ir jābūt mazākam nekā 6×10^6 uz μl ($6 \times 10^{12}/\text{l}$). Ja nepieciešams, atšķaidiet ar PBS.

Leikocītu skaitam paraugā ir jābūt mazākam nekā $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5 \times 10^9/\text{l}$). Ja nepieciešams, atšķaidiet ar PBS.

Katram analizētajam paraugam papildus testa mēģenei var pievienot vienu kontroles mēģeni, kurā šūnas tiek sajauktas ar negatīvo kontroli atbilstoši konkrētajai izvēlētajai iekrāsošanai.

1. Pievienojiet 50 μl testa parauga katrai mēģenei.
2. Katrai testa mēģenei pievienojiet nepieciešamo mAb (specifisks membrānas antigēna determinantam) daudzumu un, ja nepieciešams, katrai kontroles mēģenei pievienojiet atbilstošu daudzumu negatīvās kontroles.
3. Saudzīgi saskaliniet katru stobriņu.
4. Inkubējiet vismaz 15 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C), sargājot no gaismas.
5. Katrai mēģenei pievienojiet 100 μl reaģenta 1. Uzreiz pēc katras pievienošanas enerģiski samaisiet.
6. Inkubējiet 15 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C).
7. Katrā mēģenē pievienojiet 4 ml PBS.
8. Centrifugējiet 5 minūtes istabas temperatūrā, izmantojot 300 x g.
9. Aspirējot noņemiet virsējo slāni.
10. Katrai mēģenei pievienojiet 100 μl reaģenta 2. NESAMAISIET, ļaujiet reaģentam 2 dabīgi izšķīst šūnu lodītē.
11. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C) BEZ KRATĪŠANAS.
12. Ar roku lēni sakratiet 2–3 sekundes.
13. Katrai testa mēģenei pievienojiet nepieciešamo mAb (specifisks intracitoplazmiskā antigēna determinantam) daudzumu un, ja nepieciešams, katrai kontroles mēģenei pievienojiet atbilstošu daudzumu negatīvās kontroles.

14. Katrā kontrolstobriņā pievienojiet 20 µl izotipēšanas kontroles.
15. Saudzīgi saskaliniet katru stobriņu.
16. Inkubējiet vismaz 15 minūtes istabas temperatūrā (18–25 °C), sargājot no gaismas.
17. Katrā mēģenē pievienojiet 4 ml PBS.
18. Centrifugējiet 5 minūtes istabas temperatūrā, izmantojot 300 x g.
19. Aspirējot noņemiet virsējo slāni un šūnu centrifugātu atkārtoti suspendējiet 0,5–1 ml IOTest 3 fiksējošajā šķīdumā (REF A07800) darba koncentrācijā (1X). Šādi fiksētas sagataves 2–8 °C temperatūrā un sargājot no gaismas var glabāt 24 stundas.

VEIKTSPĒJA

Veiktspējas dati tiek iegūti, izmantojot iepriekš aprakstīto procedūru mazāk nekā 24 stundu veciem asins paraugiem, kas iepriekš paņemti sterilās mēģenēs ar EDTA sāli kā antikoagulantu. Analīze tiek veikta 2 stundu laikā pēc imūnkrāsošanas metodes izmantošanas.

PRECIZITĀTE

Procentuāli pozitīvās vērtības tika noteiktas, izmantojot pilnasinis un kaula smadzenes. Katru paraugu analizēja 4 reizes: divreiz dienā 1 dienu 2 instrumentos, izmantojot 2 partijas — IntraPrep permeabilizācijas reaģentu. Mērījumus (% pozitīvs) veica Navios plūsmas citometrā. Analīzi veica, pamatojoties uz CLSI metodi EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Kvantitatīvo mērīšanas metožu precizitātes veiktspējas novērtēšana).

Mūsu pieņemšanas kritēriji ir atkarīgi no katrai populācijai noteikto pozitīvo notikumu skaita.

- Ja pozitīvs notikums < 1500, variācijas koeficients < 15 %
- Ja pozitīvs notikums > 1500, variācijas koeficients < 10 %

Pilnasinis, EDTA:

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu tīrība							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 8877							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu atjaunošanās							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 8877							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz monocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 1070							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz granulocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 13246							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Pilnasiņu HEPARIN:

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu tīrība							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 6824							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu atjaunošanās							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 6824							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analīzē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz monocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 961							

	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz granulocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 20742							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Pilnasinis, anēmija hroniskas slimības dēļ:

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu tīrība							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 12355							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu atjaunošanās							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 12355							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz monocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 1483							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz granulocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 32715							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Kaulu smadzeņu EDTA:

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu tīrība							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 8808							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 membrānas iekrāsošana = limfocītu atjaunošanās							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 8808							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz monocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 2212							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Anti-mieloperoksidāzes FITC intracitoplazmiskā iekrāsošana uz granulocītiem							
Pozitīvo notikumu skaits (aritmētiskais vidējais) = 33181							
	Starp operatoriem	Starp citometriem	Partijā	Starp partijām	Starp analizēm	Analizē	Kopā
Variācijas koeficients (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
REZULTĀTI	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LIMFOCĪTU TĪRĪBA UN ATJAUNOŠANĀS

Limfocītiskā tīrība un atjaunošanās ir novērtēta saskaņā ar Slimību kontroles centra rekomendācijām (5). 10 veselu donoru asinis, kuru paraugi ņemti EDTA, Heparin un ACD (anēmija hroniskas slimības dēļ) stobriņos, un 5 kaulu smadzenes tika marķētas ar monoklonālo antivielu CD45-FITC un CD14-PE maisījumu. Atjaunošanās un tīrības vidējās aritmētiskās vērtības, kā arī diapazons ir norādīts tālāk redzamajās tabulās.

Pilnasiņu EDTA		
Parametrs	Atjaunošanās	Tīrība
Vidēji	93,6	89,7
Min./maks.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Pilnasiņu HEPARIN		
Parametrs	Atjaunošanās	Tīrība
Vidēji	94,3	87,6
Min./maks.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Pilnasisis, anēmija hroniskas slimības dēļ		
Parametrs	Atjaunošanās	Tīrība
Vidēji	94,2	94,6
Min./maks.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Kaulu smadzeņu EDTA		
Parametrs	Atjaunošanās	Tīrība
Vidēji	80,7	71,8
Min./maks.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

IEROBEŽOJUMI

1. Ja citometrs nav novietots precīzi līdzīni, ja nav pareizi kompensētas fluorescences noplūdes un ja reģioni nav uzmanīgi novietoti, plūsmas citometrija var radīt viltus rezultātus.
2. Noteiktas antigēna determinantes var būt jutīgas pret formaldehīdu vai pret saponīnu. Katrā laboratorijā ir jāapstiprina savi monoklonālo antivielu lietošanas nosacījumi.
3. Iegūtie rezultāti ir precīzi un reproducējami, ja visas izmantotās procedūras tiek izpildītas atbilstoši tehniskajai lietošanas instrukcijai un ir saskaņā ar labu laboratorijas praksi.
4. Šis reaģents ir optimizēts tā, lai nodrošinātu vislabāko specifiskā signāla/nespecifiskā signāla attiecību. Tāpēc ir ļoti svarīgi ievērot reaģenta tilpuma/leikocītu un eritrocītu skaita attiecību katrā testā.
5. Hiperclularitātes gadījumā atšķaidiet paraugu ar PBS, lai paraugā būtu mazāk nekā 5×10^9 leikocītu/l un mazāk nekā 6×10^{12} eritrocītu/l (6).
6. Dažos slimību stāvokļos, piemēram, izteiktas nieru mazspējas vai hemoglobīnopātijas gadījumā, eritrocītu lizēšana var būt lēna, nepilnīga vai pat neiespējama. Šajā gadījumā pirms iekrāsošanas ir ieteicams izolēt mononukleārās šūnas, izmantojot blīvuma gradientu (piemēram, Ficoll) (7).

Pielikumā skatiet piemērus un atsaucis.

PREČU ZĪMES

Beckman Coulter, stilizētais logotips un Beckman Coulter preču un pakalpojumu zīmes, kas minētas šeit, ir Beckman Coulter, Inc. preču zīmes vai reģistrētas preču zīmes Amerikas Savienotajās Valstīs un citās valstīs.

PAPILDINFORMĀCIJA

Attiecībā uz pacientiem/lietotājiem/trešajām personām Eiropas Savienībā vai valstīs ar identisku regulatīvo režīmu (Regula (ES) 2017/746 par in vitro diagnostikas medicīniskām ierīcēm); ja ierīces lietošanas laikā vai tās lietošanas rezultātā rodas nopietns negadījums, informējiet par to ražotāju un/vai tā pilnvaroto pārstāvi, kā arī valsts iestādi.

PĀRSKATĪŠANAS VĒSTURE

AF VERSIJA:	Laidiena datums: 2021. gada janvāris
AW VERSIJA:	
Atjauninājumi atbilst Beckman Coulter vispārējai marķēšanas politikai un IVD-R (ES)2017/746 prasībām:	
Pievienotas iedaļas	Paredzētais lietotājs, precizitāte, limfocītu atjaunošanās un tīrība, papildinformācija, pārskatīšanas vēsture
Pievienota informācija	Sk. sadaļas Brīdinājumi un piesardzības pasākumi, Glabāšana un Stabilitāte, Ierobežojumi
Atjauninātās sadaļas	Brīdinājumi un piesardzības pasākumi, GHS bīstamības klasifikācija, glabāšana un stabilitāte, sadalīšanās pazīmes, procedūra, veiktspēja
Izņemtās iedaļas	Atkārtotamība laboratorijā

Simbolu skaidrojumi

Simbolu glosārijs ir pieejams vietnē beckman.com/techdocs (dokumenta numurs B60062)

	Реагент 1	Реагент 2
	Фіксує речовина	Речовина для змінення проникності клітинних мембран
Приготування препарату	Рідина	Рідина
Активна речовина	Формальдегід	Сапонін
Об'єм	5 мл	5 мл
Кількість флаконів	3 флакони	3 флакони
Об'єм, необхідний для проведення тесту	100 мкл	100 мкл

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 тестів; 6 x 5 мл
2 x 0,1 мл / тест

Для діагностики *in vitro*.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Комплект IntraPrep складається з двох готових до використання реагентів, які індують проникність цитоплазматичної мембрани лейкоцитів для демонстрації внутрішньоклітинних епітопів за допомогою флуоресценції моноклональних антитіл. Комплект IntraPrep використовується для підготовки біологічних зразків для аналізу методом проточної цитометрії. Він був оптимізований для зведення до мінімуму неспецифічного забарвлення в аналізах такого типу (1,2,3,4).

ПРИНЦИП

На першому кроці клітини фіксують за допомогою реагенту 1. Після промивання додають реагент 2, що індукує клітинну проникність та залишки еритроцитів лізуються. На цій стадії клітини приводять у контакт з кон'югованими моноклональними антитілами, специфічними до внутрішньоклітинних епітопів. Після цього проводиться аналіз лейкоцитів способом проточної цитометрії.

Незважаючи на всі виконані дії залишається можливою демонстрація поверхневих епітопів. В цьому випадку конкретні кон'юговані моноклональні антитіла інкубують до виконання фіксації.

Проточний цитометр вимірює розсіювання світла та флуоресценцію клітин. Це дає можливість виділити місцезнаходження популяції всередині електронного вікна, визначеного на гістограмі, яка співвідносить ортогональне розсіювання світла (бокове розсіювання, або SS) і вузьокутове розсіювання світла (Forward Scatter, або FS). Інші гістограми, що поєднують два різні параметри, доступні на цитометрі, можна використовувати для допомоги на етапі налаштування гейтів залежно від програми, вибраної користувачем.

Флуоресценція обмеженої популяції клітин аналізується, щоб розрізнити події з позитивно забарвленими клітинами й незабарвленими. Результати виражаються як відсоток позитивних подій відносно всіх подій, зареєстрованих за допомогою гейтингу.

ЦІЛЬОВИЙ КОРИСТУВАЧ

Цей продукт призначений для професійного використання в лабораторії.

ПРОБИ

Зразки венозної крові або кісткового мозку необхідно брати в стерильні пробірки, що містять в якості антикоагулянту сіль EDTA, ACD або гепарин.

Зразки слід зберігати при кімнатній температурі (18–25°C), і їх не слід струшувати. Перш ніж узяти досліджуваний зразок, його необхідно гомогенізувати шляхом обережного перемішування.

Проби потрібно проаналізувати не пізніше ніж через 24 години після венепункції.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ Й ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
2. Не заморозуйте.
3. Зведіть до мінімуму вплив світла.
4. Уникайте мікробної контамінації реагентів, інакше можуть бути отримані помилкові результати.
5. Реагент 1 містить формальдегід. Формальдегід є токсичним і може викликати алергію. Він вважається канцерогеном.
6. Реагент 2 містить Азид натрію (NaN₃). Поводитись з ним необхідно з обережністю. Не приймайте внутрішньо й уникайте будь-якого контакту зі шкірою, слизовими оболонками та очима. Крім того, у кислому середовищі азид натрію може утворити потенційно небезпечну азотистоводневу кислоту. Якщо його потрібно утилізувати,

рекомендується розвести реагент у великій кількості води перед зливанням у водостічну систему, щоб уникнути накопичення азиду натрію на поверхні металевих труб і запобігти небезпеці вибуху.

- Усі проби крові слід розглядати як потенційно інфекційні та поводитися з ними обережно (зокрема, використовуючи захисні рукавички, халати й окуляри).
- У жодному разі не піпетуйте ротом та уникайте потрапляння проб на шкіру, слизові оболонки та в очі.
- Пробірки для крові та одноразові матеріали, які використовуються для оброблення, слід викидати в спеціальні контейнери, вміст яких призначений для спалювання.
- Реагенти та відходи потрібно утилізувати відповідно до місцевих вимог.

КЛАСИФІКАЦІЯ НЕБЕЗПЕКИ ЗА СИСТЕМОЮ GHS

Реагент 1: фіксація

НЕБЕЗПЕКА



H302	Шкідливий у разі ковтання.
H313	Може завдати шкоди в разі контакту зі шкірою
H314	Викликає серйозні опіки шкіри та пошкодження очей.
H317	Може викликати алергічну реакцію на шкірі.
H341	Ймовірно, викликає генетичні дефекти.
H350	Може викликати рак.
H370	Завдає шкоди органам.
P201	Перед використанням ознайомитися з відповідними інструкціями.
P280	Використовувати захисні рукавички, захисний одяг і засоби захисту очей/обличчя.
P303+P361+P353	У РАЗІ ПОТРАПЛЯННЯ НА ШКІРУ (або волосся): промити шкіру водою.
P305+P351+P338	У ВИПАДКУ ПОТРАПЛЯННЯ В ОЧІ: обережно промити водою протягом кількох хвилин. Зніміть контактні лінзи в разі їх наявності, і якщо це легко зробити. Продовжуйте промивання.
P310	Негайно звернутися в ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ ЦЕНТР або до лікаря. Метанол 1 - 2% Формальдегід 5 - 10%



Паспорт безпеки доступний на сайті beckman.com/techdocs

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Комплект IntraPrep зберігають при температурі 18–25°C.

Стабільність закритого флакона: реагент стабільний впродовж 517 днів.

Стабільність після відкриття флакона: реагент стабільний 90 діб.

Див. сертифікат аналізу для серії на вебсайті www.beckman.com.

ОЗНАКИ ПСУВАННЯ

Будь-яка зміна зовнішнього вигляду реагентів може вказувати на псування, і реагент не слід використовувати.

Щоб отримати додаткову інформацію або повідомити про отримання пошкодженого продукту, зателефонуйте до Служби обслуговування клієнтів Beckman Coulter за номером 800-742-2345 (США або Канада) чи зверніться до місцевого представника компанії Beckman Coulter.

ЗМІСТ

Консервант азид натрію може утворювати вибухонебезпечні сполуки в металевих зливних трубопроводах. Див. Бюлетень Національного інституту з охорони праці та промислової гігієни (NIOSH) Explosive Azide Hazard (Вибухонебезпечні азиди) (16.8.76).

Щоб уникнути можливого утворення сполук азиду, промийте зливні труби водою відразу після утилізації нерозведеного реагенту. Реагенти, що містять азид натрію, треба утилізувати з дотриманням відповідних місцевих норм.

ПОТРІБНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ВХОДЯТЬ У КОМПЛЕКТ

- Пробірки для проб і матеріали, потрібні для забору проб.
- Автоматичні піпетки з одноразовими наконечниками на 10, 20, 50, 100 та 500 мкл.
- Пластикові пробірки для гемолізу.
- Специфічні моноклональні антитіла (МАТ).
- Негативні контролю.
- Реагент для фіксації лейкоцитів. Наприклад: розчин для фіксації IOTest 3 (Ref. A07800).
- Буфер (ФСБ: 0,01 моль фосфату натрію; 0,145 моль хлориду натрію; pH 7,2).
- Центрифугування.
- Автоматичний змішувач (типу вортекс).
- Проточний цитометр.

МЕТОДИКА

А — внутрішньоклітинне забарвлення

Кількість наявних в зразку еритроцитів не має перевищувати значення 6×10^6 на мкл ($6 \times 10^{12}/л$). За необхідності розведіть в буферному розчині PBS.

Кількість наявних в зразку лейкоцитів не має перевищувати значення 5×10^3 на мкл ($5 \times 10^9/л$). За необхідності розведіть в буферному розчині PBS.

Для кожної аналізованої проби на додачу до тестової пробірки можна додати одну контрольну пробірку, у якій клітини змішано в присутності негативного контролю відповідно до обраного конкретного забарвлення.

1. Додайте по 50 мкл досліджуваної проби в кожен пробірку.
2. Додайте по 100 мкл реагенту 1 в кожен пробірку. Енергійно змішайте вихровим способом відразу ж після кожного додавання.
3. Інкубуйте протягом 15 хвилин при кімнатній температурі ($18-25^{\circ}C$).
4. Додайте 4 мл ФСБ до кожної пробірки.
5. Центрифугуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин при 300 g.
6. Видаліть надосадову рідину аспіратором.
7. Додайте по 100 мкл реагенту 2 в кожен пробірку. НЕ ВИКОРИСТОВУЙТЕ ЗМІШУВАННЯ ВИХРОВИМ СПОСОБОМ, залиште реагент 2 природним чином дифундувати в осад клітин.
8. Інкубуйте протягом 5 хвилин при кімнатній температурі ($18-25^{\circ}C$), НЕ СТРУШУЮЧИ.
9. Повільно струшуйте вручну протягом 2–3 секунд.
10. Додайте необхідну кількість МАТ (специфічну для внутрішньоцитоплазматичної антигенної детермінанти) до кожної тестової пробірки і, за необхідності, відповідну кількість негативного контролю до кожної контрольної пробірки.
11. Обережно перемішайте вихровим способом пробірку за пробіркою.
12. Інкубуйте протягом 15 хвилин за кімнатної температури ($18-25^{\circ}C$) у захищеному від світла місці.
13. Додайте 4 мл ФСБ до кожної пробірки.
14. Центрифугуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин при 300 g.
15. Видаліть супернатант за допомогою аспірації та ресуспендуйте клітинний осад в 0,5 або 1 мл фіксуючого розчину IOTest 3 (REF. № A07800) в робочій концентрації (1X). Зафіксовані таким чином препарати можна зберігати протягом 24 годин при температурі від 2 до $8^{\circ}C$ в захищеному від світла місці.

В — внутрішньоцитоплазматичне та мембранне забарвлення

Кількість наявних в зразку еритроцитів не має перевищувати значення 6×10^6 на мкл ($6 \times 10^{12}/л$). За необхідності розведіть в буферному розчині PBS.

Кількість лейкоцитів в зразку не має перевищувати значення 5×10^3 на мкл (5×10^9 /л). За необхідності розведіть в буферному розчині PBS.

Для кожної аналізованої проби на додачу до тестової пробірки можна додати одну контрольну пробірку, у якій клітини змішано в присутності негативного контролю відповідно до обраного конкретного забарвлення.

1. Додайте по 50 мкл досліджуваної проби в кожну пробірку.
2. Додайте необхідну кількість МАТ (специфічну для мембранної антигенної детермінанти) в кожну тестову пробірку і, за необхідності, додайте відповідну кількість негативного контролю в кожну контрольну пробірку.
3. Обережно перемішайте вихровим способом пробірку за пробіркою.
4. Інкубуйте протягом 15 хвилин за кімнатної температури (18–25°C) у захищеному від світла місці.
5. Додайте по 100 мкл реагенту 1 в кожну пробірку. Енергійно змішайте вихровим способом відразу ж після кожного додавання.
6. Інкубуйте протягом 15 хвилин при кімнатній температурі (18–25°C).
7. Додайте 4 мл ФСБ до кожної пробірки.
8. Центрифугуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин при 300 g.
9. Видаліть надосадову рідину аспіратором.
10. Додайте по 100 мкл реагенту 2 в кожну пробірку. НЕ ВИКОРИСТОВУЙТЕ ЗМІШУВАННЯ ВИХРОВИМ СПОСОБОМ, залиште реагент 2 природним чином дифундувати в осад клітин.
11. Інкубуйте протягом 5 хвилин при кімнатній температурі (18–25°C), НЕ СТРУШУЮЧИ.
12. Повільно струшуйте вручну протягом 2–3 секунд.
13. Додайте необхідну кількість МАТ (специфічну для внутрішньоцитоплазматичної антигенної детермінанти) до кожної тестової пробірки і, за необхідності, відповідну кількість негативного контролю до кожної контрольної пробірки.
14. У кожну контрольну пробірку додайте 20 мкл ізотипічного контролю.
15. Обережно перемішайте вихровим способом пробірку за пробіркою.
16. Інкубуйте протягом 15 хвилин за кімнатної температури (18–25°C) у захищеному від світла місці.
17. Додайте 4 мл ФСБ до кожної пробірки.
18. Центрифугуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин при 300 g.
19. Видаліть супернатант за допомогою аспірації та ресуспендуйте клітинний осад в 0,5 або 1 мл фіксуючого розчину IOTest 3 (REF. № A07800) в робочій концентрації (1X). Зафіксовані таким чином препарати можна зберігати протягом 24 годин при температурі від 2 до 8°C в захищеному від світла місці.

ЕФЕКТИВНІСТЬ

Робочі показники ефективності отримуються з використанням процедури, описаної вище, на пробах крові, які були відібрані в стерильні пробірки із сіллю ЕДТА як антикоагулянт, а також зберігалися менше ніж 24 години. Аналіз проводиться впродовж 2 годин після імунного фарбування.

ПРЕЦИЗІЙНІСТЬ

Відсоток позитивних значень визначався за допомогою цільної крові та кісткового мозку. Кожну пробу обробляли 4 рази, двічі на добу впродовж 1 доби на 2 приладах, використовуючи 2 партії пермеабілізуючого реагенту IntraPrep. Вимірювання (% позитивних значень) виконували на проточному цитометрі Navios. Аналіз проводився на основі методу CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Оцінювання прецизійності кількісних методів вимірювання).

Наші критерії прийнятності залежать від кількості позитивних подій, виміряних для кожної популяції.

- Якщо кількість позитивних подій < 1500, КВ < 15%
- Якщо кількість позитивних подій > 1500, КВ < 10%

Цільна кров з ЕДТА:

Забарвлення мембран CD45/CD14 = чистота лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 8877							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Забарвлення мембран CD45/CD14 = відновлення лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 8877							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на моноцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 1070							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на гранулоцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 13246							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Цільна кров з гепарином:

Забарвлення мембран CD45/CD14 = чистота лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 6824							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Забарвлення мембран CD45/CD14 = відновлення лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 6824							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на моноцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 961							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на гранулоцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 20742							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Цільна кров з ACD:

Забарвлення мембран CD45/CD14 = чистота лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 12355							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Забарвлення мембран CD45/CD14 = відновлення лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 12355							

	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на моноцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 1483							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на гранулоцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 32715							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Кістковий мозок з ЕДТА:

Забарвлення мембран CD45/CD14 = чистота лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 8808							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Забарвлення мембран CD45/CD14 = відновлення лімфоцитів							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 8808							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на моноцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 2212							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Інтрацитоплазматичне забарвлення на гранулоцитах анти-мієлопероксидазою-FITC							
Кількість позитивних подій (середнє значення) = 33181							
	Між операторами	Між цитометрами	У межах однієї серії	Між серіями	Між серіями вимірювань	У межах однієї серії вимірювань	Усього
КВ (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
РЕЗУЛЬТАТИ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ЧИСТОТА ТА ВІДНОВЛЕННЯ ЛІМФОЦИТІВ

Чистоту та відновлення лімфоцитів оцінювали відповідно до рекомендацій CDC (5). Кров 10 здорових донорів, відібраних у ЕДТА, гепарині, АСД, і 5 зразків кісткового мозку маркували сумішшю моноклональних антитіл CD45-FITC та CD14-PE. Середні значення відновлення та чистоти, а також діапазон наведені в наступних таблицях:

Цільна кров з ЕДТА		
Параметр	Відновлення	Чистота
Усереднена	93,6	89,7
Мін./Макс.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Цільна кров з гепарином		
Параметр	Відновлення	Чистота
Усереднена	94,3	87,6
Мін./Макс.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Цільна кров з АСД		
Параметр	Відновлення	Чистота
Усереднена	94,2	94,6
Мін./Макс.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Кістковий мозок з ЕДТА		
Параметр	Відновлення	Чистота
Усереднена	80,7	71,8
Мін./Макс.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

ОБМЕЖЕННЯ

1. Результати проточної цитометрії можуть бути помилковими, якщо вказане нижче не було виконано належним чином: вирівняно цитометр, скомпенсовано витік флуоресценції, здійснено позиціонування ділянок.
2. Певні епітопи можуть бути чутливими до формальдегіду або сапоніну. Кожна лабораторія має валідувати умови використання моноклональних антитіл.
3. Буде отримано точні й відтворювані результати, якщо процедури застосовуються відповідно до технічної інструкції, що додається, і стандартів належної лабораторної практики.
4. Цей реагент був оптимізований для надання кращого з можливих співвідношень специфічного сигналу до неспецифічного сигналу. Тому важливо дотримуватися співвідношення об'єму реагенту та кількості лейкоцитів та еритроцитів у кожному тесті.
5. За наявності занадто великої кількості клітин розведіть всі зразки з використанням буферного розчину PBS до отримання значення менше ніж 5×10^9 лейкоцитів/л та менше ніж 6×10^{12} еритроцитів/л (6).
6. У разі деяких захворювань або станів, як-от тяжка ниркова недостатність або гемоглобінопатії, лізис еритроцитів може бути повільним, неповним або навіть неможливим. У цьому разі рекомендується виділяти мононуклеарні клітини за градієнтом щільності (з використанням фіколу, наприклад) перед фарбуванням (7).

Див. приклади й посилання в додатку.

ТОРГОВЕЛЬНІ МАРКИ

Beckman Coulter, стилізований логотип, товарні знаки й сервісні марки Beckman Coulter, вказані тут, є торговельними марками або зареєстрованими торговельними марками компанії Beckman Coulter, Inc. у Сполучених Штатах Америки й інших країнах.

ДОДАТКОВА ІНФОРМАЦІЯ

Для пацієнта / користувача / третьої сторони в Європейському Союзі та в країнах з ідентичною системою нормативного регулювання (Регламент 2017/746/ЄС про медичні вироби для діагностики in vitro); якщо під час використання цього пристрою або в результаті його використання стався серйозний інцидент, повідомте про це виробнику й (або) його уповноваженому представнику та місцевому національному органу.

ІСТОРІЯ ЗМІН

РЕДАКЦІЯ AF	Дата випуску: Січень 2021 р.
РЕДАКЦІЯ AW	
Оновлення мають відповідати Глобальній політиці щодо маркування компанії Beckman Coulter і вимогам IVD-R (ЄС)2017/746:	
Додані розділи	Цільовий користувач, Прецизійність, Відновлення та чистота лімфоцитів, Додаткова інформація, Історія змін
Додана інформація	Див. розділи «Попередження та запобіжні заходи», «Зберігання та стабільність», «Обмеження»
Оновлені розділи	Попередження та запобіжні заходи, Класифікація небезпек GHS, Зберігання та стабільність, Ознаки псування, Процедура, Робочі характеристики
Видалені розділи	Внутрішньолaboratorна відтворюваність

Список символів

Глосарій символів доступний на сайті beckman.com/techdocs (документ № B60062)

	Reagente 1	Reagente 2
	Agente fixador	Agente permeabilizante
Formulação	Líquido	Líquido
Substância ativa	Formaldeído	Saponina
Volume	5 mL	5 mL
Número de frascos	3 frascos	3 frascos
Volume por teste	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 testes; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL por teste

Para uso em diagnóstico *in vitro*

USO PREVISTO

O IntraPrep consiste em dois reagentes prontos para uso que induzem a permeabilidade da membrana citoplasmática dos leucócitos para a demonstração de determinantes antigênicos intracelulares por meio de anticorpos fluorescentes monoclonais. O IntraPrep é utilizado na preparação de amostras biológicas para análise por citometria de fluxo. Ele tem sido otimizado para minimizar a coloração não específica neste tipo de análise (1,2,3,4).

PRINCÍPIO

Como primeiro passo, as células são fixadas com o reagente 1. Após a lavagem, a permeabilidade é induzida com o reagente 2 e os eritrócitos remanescentes são lisados. Durante essa etapa, as células são colocadas em contato com anticorpos monoclonais conjugados específicos para determinantes antigênicos intracelulares. Em seguida, os leucócitos são analisados por citometria de fluxo.

A demonstração de determinantes antigênicos de superfície continua a ser possível. Nesse caso, os anticorpos monoclonais conjugados específicos são incubados antes da fixação.

O citômetro de fluxo mede a dispersão da luz e a fluorescência das células. Ele possibilita a localização da população de interesse na janela eletrônica definida em um histograma, que correlaciona a dispersão ortogonal da luz (dispersão lateral ou DL) e a dispersão de luz de ângulo estreito (dispersão frontal ou DF). Outros histogramas que combinam dois dos diferentes parâmetros disponíveis no citômetro também são utilizados no estágio de delimitação, dependendo da aplicação escolhida pelo usuário.

A fluorescência das células delimitadas é analisada para distinguir os eventos de coloração positiva daqueles sem coloração. Os resultados são expressos como uma porcentagem dos eventos positivos em relação a todos os eventos adquiridos pela delimitação.

USUÁRIO PREVISTO

Este produto destina-se ao uso laboratorial profissional.

AMOSTRAS

As amostras de sangue venoso ou de medula óssea devem ser coletadas utilizando tubos de amostra estéreis que contenham um sal de EDTA, ACD ou heparina como anticoagulante.

As amostras devem ser mantidas a temperatura ambiente (18–25°C) e não devem ser agitadas. As amostras devem ser homogêneas por agitação delicada antes da remoção da amostra de teste.

As amostras devem ser analisadas no prazo de 24 horas após a coleta.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Não use o reagente após o prazo de validade.
2. Não congele.
3. Minimizar a exposição à luz.
4. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, pois isso pode gerar falsos resultados.
5. O reagente 1 contém formaldeído. O formaldeído é tóxico e alergênico. Acredita-se que seja um agente carcinogênico.
6. O reagente 2 contém azida sódica (NaN₃). Deve ser manipulado com cuidado. Não utilize internamente e evite o contato com pele, mucosas e olhos. Além disso, em meios ácidos, a azida sódica pode formar um ácido hidrazoico potencialmente perigoso. Se for preciso 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 nitreto de sódio 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 à incineração.
10. Os reagentes e os resíduos devem ser eliminados de acordo com os requisitos locais.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

Reagente 1: Fixação

PERIGO



H302	Nocivo por ingestão.
H313	Pode ser nocivo em contato com a pele
H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
H317	Pode provocar reações alérgicas na pele.
H341	Suspeito de provocar anomalias genéticas.
H350	Pode provocar câncer.
H370	Provoca lesões aos órgãos.
P201	Obtenha instruções específicas antes do uso.
P280	Use luvas de proteção, roupa de proteção e proteção ocular/facial.
P303+P361+P353	EM CASO DE CONTATO COM A PELE (ou com o cabelo): enxágue a pele com água.
P305+P351+P338	EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: enxágue cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se for fácil. Continuar enxaguando.
P310	Chame imediatamente um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou um médico. Metanol 1 - 2% Formaldeído 5 - 10%



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

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A IntraPrep é armazenada entre 18–25°C.

Estabilidade do frasco fechado: o reagente é estável por 517 dias.

Estabilidade do frasco aberto: o reagente é estável por 90 dias.

Consulte o certificado de análise específico do lote em www.beckman.com.

EVIDÊNCIA DE DETERIORAÇÃO

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

Para obter informações adicionais ou se o produto recebido estiver danificado, entre em contato com o serviço de atendimento ao cliente da Beckman Coulter através do número 800-742-2345 (EUA ou Canadá) ou entre em contato com o representante local da Beckman Coulter.

CONTEÚDO

A azida sódica utilizada como conservante pode formar compostos explosivos em canos de escoamento metálicos. Consulte o Boletim do NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health [Instituto de segurança e saúde ocupacional dos EUA]): Explosive Azide Hazard (Perigos de explosão de azida) (16/8/76).

Para evitar o possível acúmulo 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 10, 20, 50, 100 e 500 µL.
- Tubos plásticos de hemólise.
- Anticorpos monoclonais específicos (mAb).
- Controles negativos.
- Reagente de fixação de leucócitos. Por exemplo: Solução fixadora IOTest 3 (Ref. A07800).
- Tampão (PBS: fosfato de sódio a 0,01 M; cloreto de sódio a 0,145 M; pH 7,2).
- Centrífuga.
- Agitador automático (tipo vórtex).
- Citômetro de fluxo.

PROCEDIMENTO

A — Coloração intracitoplasmática

A concentração de glóbulos vermelhos na amostra deve ser inferior a 6×10^6 por µL (6×10^{12} /L). Se necessário, dilua em PBS.

A concentração de leucócitos na amostra deve ser inferior a 5×10^3 por µL (5×10^9 /L). Se necessário, dilua em PBS.

Para cada amostra analisada, além do tubo de teste, um tubo de controle pode ser adicionado no qual as células são misturadas na presença do controle negativo correspondente à coloração específica selecionada.

1. Adicione 50 µL da amostra de teste a cada tubo.
2. Adicione 100 µL de reagente 1 a cada tubo. Agite fortemente o vórtice imediatamente após cada adição.
3. Incube durante 15 minutos em temperatura ambiente (18–25°C).
4. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
5. Centrifugue por 5 minutos a 300 x g a temperatura ambiente.
6. Retire o sobrenadante por aspiração.
7. Adicione 100 µL do reagente 2 a cada tubo. **NÃO AGITE EM VÓRTEX.** Deixe o reagente 2 difundir naturalmente no precipitado celular.
8. Incube durante 5 minutos em temperatura ambiente (18–25°C) SEM AGITAR.
9. Agite levemente à mão 2 a 3 segundos.
10. Adicione a quantidade necessária de mAb (específico para um determinante antigênico intracitoplasmático) a cada tubo de teste e, se necessário, adicione a quantidade apropriada de controle negativo a cada tubo de controle.
11. Agite o vórtice cuidadosamente tubo a tubo.
12. Incube durante 15 minutos em temperatura ambiente (18–25°C), protegido da luz.
13. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
14. Centrifugue por 5 minutos a 300 x g a temperatura ambiente.
15. Remova o sobrenadante por aspiração e ressuspenda o precipitado celular com 0,5 mL ou 1 mL de solução fixativa IOTest 3 (REF A07800) à concentração de trabalho (1X). Depois de fixadas, as preparações podem ser armazenadas durante 24 horas entre 2 e 8°C protegidas da luz.

B — Coloração intracitoplasmática e das membranas

A concentração de glóbulos vermelhos na amostra deve ser inferior a 6×10^6 por µL (6×10^{12} /L). Se necessário, dilua com PBS.

A concentração de leucócitos na amostra deve ser inferior a 5×10^3 por µL (5×10^9 /L). Se necessário, dilua com PBS.

Para cada amostra analisada, além do tubo de teste, um tubo de controle pode ser adicionado no qual as células são misturadas na presença do controle negativo correspondente à coloração específica selecionada.

1. Adicione 50 µL da amostra de teste a cada tubo.
2. Adicione a quantidade necessária de mAb (específico para um determinante antigênico membranoso) a cada tubo de teste e, se necessário, adicione a quantidade apropriada de controle negativo a cada tubo de controle.
3. Agite o vórtice cuidadosamente tubo a tubo.
4. Incube durante 15 minutos em temperatura ambiente (18–25°C), protegido da luz.
5. Adicione 100 µL de reagente 1 a cada tubo. Agite fortemente o vórtice imediatamente após cada adição.

6. Incube durante 15 minutos em temperatura ambiente (18–25°C).
7. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
8. Centrifugue por 5 minutos a 300 x g a temperatura ambiente.
9. Retire o sobrenadante por aspiração.
10. Adicione 100 µL do reagente 2 a cada tubo. NÃO AGITE EM VÓRTEX. Deixe o reagente 2 difundir naturalmente no precipitado celular.
11. Incube durante 5 minutos em temperatura ambiente (18–25°C) SEM AGITAR.
12. Agite levemente à mão 2 a 3 segundos.
13. Adicione a quantidade necessária de mAb (específico para um determinante antigênico intracitoplasmático) a cada tubo de teste e, se necessário, adicione a quantidade apropriada de controle negativo a cada tubo de controle.
14. Ao tubo de controle, adicione 20 µL de controle isotópico.
15. Agite o vórtice cuidadosamente tubo a tubo.
16. Incube durante 15 minutos em temperatura ambiente (18-25°C), protegido da luz.
17. Adicione 4 mL de PBS a cada tubo.
18. Centrifugue por 5 minutos a 300 x g a temperatura ambiente.
19. Remova o sobrenadante por aspiração e ressuspenda o precipitado celular com 0,5 mL ou 1 mL de solução fixativa IOTest 3 (REF A07800) à concentração de trabalho (1X). Depois de fixadas, as preparações podem ser armazenadas durante 24 horas entre 2 e 8°C protegidas da luz.

DESEMPENHO

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

PRECISÃO

Os valores percentuais positivos foram determinados usando-se sangue total e medula óssea. Cada amostra foi processada 4 vezes, duas vezes por dia durante 1 dia em 2 instrumentos, usando 2 lotes do reagente de permeabilização IntraPrep. As medições (% de positivos) foram realizadas no citômetro de fluxo Navios. A análise foi realizada com base no método EP5-A2 do CLSI: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Avaliação de desempenho de precisão de métodos de medição quantitativos).

Nossos critérios de aceitação dependem do número de eventos positivos medidos para cada população:

- Se eventos positivos <1.500, CV <15%
- Se eventos positivos >1.500, CV <10%

Sangue total em EDTA:

Coloração de membrana CD45/CD14 = pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8877							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamentos	Dentro do processamento	Total
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração de membrana CD45/CD14 = recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8877							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamentos	Dentro do processamento	Total
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 1070							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamentos	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 13246							

	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sangue total em HEPARINA:

Coloração de membrana CD45/CD14 = pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 6824							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração de membrana CD45/CD14 = recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 6824							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 961							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 20742							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Sangue total em ACD:

Coloração de membrana CD45/CD14 = pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 12355							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração de membrana CD45/CD14 = recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 12355							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 1483							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 32715							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Medula óssea em EDTA:

Coloração de membrana CD45/CD14 = pureza linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8808							

	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração de membrana CD45/CD14 = recuperação linfocítica							
Número de eventos positivos (média) = 8808							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em monócitos							
Número de eventos positivos (média) = 2212							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Coloração intracitoplasmática de antimieloperoxidase-FITC em granulócitos							
Número de eventos positivos (média) = 33181							
	Entre operadores	Entre citômetros	Dentro do lote	Entre lotes	Entre processamento	Dentro do processamento	Total
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RESULTADOS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

RECUPERAÇÃO E PUREZA LINFOCÍTICAS

A recuperação e pureza linfocíticas foram avaliadas de acordo com as recomendações do CDC (5). O sangue de 10 doadores saudáveis amostrado em EDTA, heparina e ACD e 5 medulas ósseas foram marcados com uma mistura de anticorpos monoclonais CD45-FITC e CD14-PE. Os valores médios da recuperação e da pureza, bem como a faixa, são apresentados nas tabelas a seguir:

Sangue total em EDTA		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	93,6	89,7
Mín./Máx.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Sangue total em HEPARINA		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	94,3	87,6
Mín./Máx.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Sangue total em ACD		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	94,2	94,6
Mín./Máx.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Medula óssea em EDTA		
Parâmetro	Recuperação	Pureza
Média	80,7	71,8
Mín./Máx.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

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. Alguns determinantes antigênicos podem ser sensíveis ao formaldeído ou à saponina. Cada laboratório deve validar as condições de utilização dos anticorpos monoclonais.
3. Serão obtidos resultados exatos e reproduzíveis desde que os procedimentos utilizados estejam em conformidade com o folheto técnico e sejam compatíveis com as boas práticas de laboratório.
4. Esse reagente tem sido otimizado para oferecer a melhor relação entre sinal específico e sinal não específico. Por isso, é importante considerar a relação entre volume do reagente e número de leucócitos e eritrócitos em cada teste.
5. No caso de hiperclularidade, dilua a amostra em PBS para obter uma concentração inferior a 5×10^9 de leucócitos/L e inferior a 6×10^{12} de glóbulos vermelhos/L (6).

6. Em certos estados da doença, como insuficiência renal grave e hemoglobinopatias, a lise das hemácias pode ser lenta, incompleta ou até mesmo impossível. Nesse caso, recomenda-se isolar as células mononucleadas usando um gradiente de densidade (Ficoll, por exemplo) antes da coloração (7).

Consulte o anexo para obter exemplos e referências.

MARCAS COMERCIAIS

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

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para um paciente/usuário/terceiro na União Europeia e em países com regime regulatório idêntico (Regulamentação 2017/746/UE sobre In vitro Diagnostic Medical Devices [Dispositivos médicos de diagnóstico in vitro]), se, durante o uso deste dispositivo ou como resultado de seu uso, ocorrer um incidente grave, relate-o ao fabricante e/ou ao seu representante autorizado e à sua autoridade nacional.

HISTÓRICO DE REVISÃO

REVISÃO AF:	Data de publicação: Janeiro de 2021
REVISÃO AW:	
Atualizações para o cumprimento da Global labelling Policy (Política de rotulagem global) da Beckman Coulter e de acordo com os requisitos da IVD-R (UE)2017/746:	
Seções adicionadas	Usuário pretendido, Precisão, Recuperação e pureza linfocíticas, Informações adicionais, Histórico de revisão
Informações adicionadas	Consulte as seções Avisos e precauções, Armazenamento e estabilidade, Limitações
Seções atualizadas	Avisos e precauções, Classificação de perigo do SGH, Armazenamento e estabilidade, Evidência de deterioração, Procedimento, Desempenho
Seções removidas	Reprodutibilidade intralaboratorial

Legenda dos símbolos

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

	Reagens 1	Reagens 2
	Fixeermiddel	Permeabilisatiemiddel
Samenstelling	Vloeibaar	Vloeibaar
Actieve stof	Formaldehyde	Saponine
Volume	5 mL	5 mL
Aantal buisjes	3 buisjes	3 buisjes
Volume per test	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 150 tests; 6 x 5 mL
2 x 0,1 mL / test

Voor *in vitro* diagnostisch gebruik

BEOOGD GEBRUIK

IntraPrep bestaat uit twee gebruiksklare reagentia, die in het cytoplasmatische membraan van leukocyten de permeabiliteit induceren voor het aantonen van intracellulaire antigene determinanten door middel van monoklonale fluorescente antilichamen. IntraPrep wordt gebruikt om biologische monsters voor te bereiden voor analyse door middel van flowcytometrie. Het is geoptimaliseerd om de niet-specifieke kleuring in dit type analyse te minimaliseren (1,2,3,4).

PRINCIPE

Als eerste stap worden de cellen gefixeerd met reagens 1. Na spoelen wordt permeabiliteit geïnduceerd met reagens 2 en worden de resterende erythrocyten gelyseerd. Gedurende dit stadium worden de cellen in contact gebracht met geconjugeerde monoklonale antilichamen die specifiek zijn voor intracellulaire antigene determinanten. De leukocyten worden vervolgens geanalyseerd door middel van flowcytometrie.

De demonstratie van oppervlakte-antigene determinanten blijft niettemin mogelijk. In dit geval worden de specifieke geconjugeerde monoklonale antilichamen vóór de fixatie geïncubeerd.

De flowcytometer meet de lichtdiffusie en de fluorescentie van cellen. Het maakt de lokalisatie van de betrokken populatie mogelijk binnen het elektronische venster gedefinieerd op een histogram, wat de orthogonale verspreiding van licht (zijwaartse verstrooiing of ZV) in verband brengt met de verspreiding van smalhoekig licht (voorwaartse verstrooiing of VV). Andere histogrammen die twee van de verschillende beschikbare parameters op de cytometer combineren, kunnen worden gebruikt als ondersteuning bij de gating-fase, afhankelijk van de door de gebruiker gekozen toepassing.

De fluorescentie van de afgeperkte cellen wordt geanalyseerd om de positief-gekleurde gebeurtenissen te onderscheiden van de niet-gekleurde. De resultaten worden uitgedrukt als een percentage van positieve gebeurtenissen ten opzichte van alle gebeurtenissen verzameld door de gating.

BEOOGDE GEBRUIKER

Dit product is bedoeld voor professioneel gebruik in het laboratorium.

MONSTERS

Monsters van veneus bloed of beenmerg moeten worden afgenomen met steriele buisjes die EDTA-zout of ACD of heparine bevatten als anticoagulans.

De monsters moeten op kamertemperatuur (18-25 °C) worden gehouden en mogen niet worden geschud. Het monster moet gehomogeniseerd worden door licht te schudden voordat het testmonster wordt afgenomen.

De monsters moeten worden geanalyseerd binnen 24 uur van venapunctie.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMATREGELEN

1. Gebruik het reagens niet na de uiterste houdbaarheidsdatum.
2. Niet invriezen.
3. Beperk de blootstelling aan licht.
4. Vermijd microbiële verontreiniging van de reagentia, anders kunnen verkeerde resultaten optreden.
5. Reagens 1 bevat formaldehyde. Formaldehyde is toxisch en allergeen. Het is vermoedelijk een kankerverwekkende stof.
6. Reagens 2 bevat natriumazide (NaN₃). Het moet met zorg behandeld worden. Niet innemen en elk contact met huid, slijmvliezen en ogen vermijden. In een zuur medium kan natriumazide bovendien de potentieel gevaarlijke waterstofazide vormen. Indien verwijdering nodig is, wordt het aanbevolen om het reagens te verdunnen in een groot volume water voordat het in het afvoersysteem wordt gegoten, om de accumulatie van natriumazide in metalen buizen en explosiegevaar te vermijden.

7. Alle bloedmonsters moeten worden beschouwd als mogelijk besmettelijk en moeten voorzichtig worden gehanteerd (met name: veiligheidshandschoenen, -jas en -bril dragen).
8. Pipetteer nooit met de mond en vermijd elk contact van de monster met huid, slijmvliezen en ogen.
9. Bloedbuisjes en wegwerpmateriaal die gebruikt zijn, moeten verwijderd worden in afvalcontainers bestemd voor verbranding.
10. Reagentia en afval moeten verwijderd worden volgens de plaatselijke voorschriften.

GHS GEVARENCLASSIFICATIE

Reagens 1: fixatie

GEVAAR



H302	Schadelijk bij inslikken.
H313	Kan schadelijk zijn bij contact met de huid
H314	Veroorzaakt ernstige brandwonden op de huid en oogletsel.
H317	Kan een allergische huidreactie veroorzaken.
H341	Verdacht van het veroorzaken van genetische afwijkingen.
H350	Kan kanker verwekken.
H370	Veroorzaakt schade aan organen.
P201	Win speciale instructies in voorafgaand aan het gebruik.
P280	Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.
P303+P361+P353	INDIEN OP HUID (of in haren): huid afspoeien met water.
P305+P351+P338	INDIEN IN OGEN: gedurende verschillende minuten voorzichtig spoelen met water. Indien aanwezig en mogelijk: contactlenzen verwijderen. Blijven spoelen.
P310	Bel onmiddellijk een GIFCENTRUM of een arts. Methanol 1 - 2% Formaldehyde 5 - 10%



Het veiligheidsinformatieblad is beschikbaar op beckman.com/techdocs

OPSLAG EN STABILITEIT

IntraPrep wordt bewaard bij 18-25 °C.

Stabiliteit van afgesloten buisje: het reagens is stabiel gedurende 517 dagen.

Stabiliteit van geopend buisje: het reagens is stabiel gedurende 90 dagen.

Zie batch-specifiek analysecertificaat op www.beckman.com.

BEWIJS VAN BEDERF

Elke wijziging in de fysieke verschijning van de reagentia kan wijzen op aantasting; het reagens mag dan niet langer gebruikt worden.

Bel voor meer informatie, of als het product beschadigd is, met de klantenservice van Beckman Coulter op 800-742-2345 (VS of Canada) of neem contact op met uw plaatselijke vertegenwoordiger van Beckman Coulter.

INHOUD

Een conserveringsmiddel van natriumazide kan explosieve verbindingen vormen in metalen afvoerleidingen. Zie NIOSH-bulletin: Explosive Azide Hazard (Explosiegevaar van azide, 16-08-1976).

Om de ophoping van azideverbindingen te vermijden, spoelt u de afvoerbuizen met water na verwijdering van onverdund reagens. Natriumazide moet worden verwijderd volgens de toepasselijke plaatselijke voorschriften.

BENODIGD MATERIAAL DAT NIET IS MEEGELEVERD IN DE KIT:

- Monsterbuisjes en materiaal vereist voor monsterneming.
- Automatische pipetten met wegwerptips voor 10, 20, 50, 100 en 500 μL .
- Plastic hemolysebuisjes.
- Specifieke monoklonale antilichamen (mAb).
- Negatieve controles.
- Fixatiereagens voor leukocyten. Bijvoorbeeld: IOTest 3-fixeeroplossing (ref. A07800).
- Buffer (PBS: 0,01 M natriumfosfaat; 0,145 M natriumchloride; pH 7,2).
- Centrifugeer.
- Automatische schudder (vortextype).
- Flowcytometer.

PROCEDURE

A - Intracytoplasmatische kleuring

Het aantal rode bloedcellen in het monster moet minder dan 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) bedragen. Verdun indien nodig in PBS.

Het aantal leukocyten in het monster moet minder dan $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) bedragen. Verdun indien nodig in PBS.

Voor elk geanalyseerd monster kan naast het testbuisje één controlebuisje worden toegevoegd, waarin de cellen worden gemengd in aanwezigheid van de negatieve controle die overeenkomt met de specifieke gekozen kleuring.

1. Voeg 50 μL van het testmonster toe aan elk busje.
2. Voeg 100 μL reagens 1 toe aan elk busje. Wervel krachtig onmiddellijk na elke toevoeging.
3. Incubeer 15 minuten op kamertemperatuur (18-25 $^{\circ}\text{C}$).
4. Voeg 4 mL PBS toe aan elke bus.
5. Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 300 x g op kamertemperatuur.
6. Verwijder het supernatant door opzuiging.
7. Voeg 100 μL reagens 2 toe aan elk busje. NIET WERVELEN, laat reagens 2 op natuurlijke wijze in de celpellet diffunderen.
8. Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur (18-25 $^{\circ}\text{C}$), ZONDER TE SCHUDDEN.
9. Schud 2 tot 3 seconden zachtjes met de hand.
10. Voeg de benodigde hoeveelheid mAb (specifiek voor een intracytoplasmatische antigeendeterminant) toe aan elk testbuisje en voeg zo nodig de juiste hoeveelheid negatieve controle toe aan elk controlebuisje.
11. Wervel de busjes een voor een voorzichtig.
12. Incubeer 15 minuten op kamertemperatuur (18-25 $^{\circ}\text{C}$), beschermd tegen licht.
13. Voeg 4 mL PBS toe aan elke bus.
14. Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 300 x g op kamertemperatuur.
15. Verwijder het supernatant door opzuiging en suspendeer de celpellet opnieuw in 0,5 of 1 mL IOTest 3-fixeeroplossing (ref. A07800) bij de werkconcentratie (1X). Zodanig gefixeerd kunnen de bereidingen tussen 2 en 8 $^{\circ}\text{C}$ en uit het licht 24 uur worden bewaard.

B - Intracytoplasmatische en membraantechnische kleuring

Het aantal rode bloedcellen in het monster moet minder dan 6×10^6 per μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$) bedragen. Verdun indien nodig met PBS.

Het aantal leukocyten in het monster moet minder dan $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) bedragen. Verdun indien nodig met PBS.

Voor elk geanalyseerd monster kan naast het testbuisje één controlebuisje worden toegevoegd, waarin de cellen worden gemengd in aanwezigheid van de negatieve controle die overeenkomt met de specifieke gekozen kleuring.

1. Voeg 50 μL van het testmonster toe aan elk busje.
2. Voeg de benodigde hoeveelheid mAb (specifiek voor een membraanantigeendeterminant) toe aan elk testbuisje en voeg zo nodig de juiste hoeveelheid negatieve controle toe aan elk controlebuisje.
3. Wervel de busjes een voor een voorzichtig.

4. Incubeer 15 minuten op kamertemperatuur (18-25 °C), beschermd tegen licht.
5. Voeg 100 µL reagens 1 toe aan elk buisje. Wervel krachtig onmiddellijk na elke toevoeging.
6. Incubeer 15 minuten op kamertemperatuur (18-25 °C).
7. Voeg 4 mL PBS toe aan elke buis.
8. Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 300 x g op kamertemperatuur.
9. Verwijder het supernatant door opzuiging.
10. Voeg 100 µL reagens 2 toe aan elk buisje. NIET WERVELEN, laat reagens 2 op natuurlijke wijze in de celpellet diffunderen.
11. Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur (18-25 °C), ZONDER TE SCHUDDEN.
12. Schud 2 tot 3 seconden zachtjes met de hand.
13. Voeg de benodigde hoeveelheid mAb (specifiek voor een intracytoplasmische antigeendeterminant) toe aan elk testbuisje en voeg zo nodig de juiste hoeveelheid negatieve controle toe aan elk controlebuisje.
14. Voeg aan elke controlebuis 20 µL isotypische controle toe.
15. Wervel de buisjes een voor een voorzichtig.
16. Incubeer 15 minuten op kamertemperatuur (18-25 °C), beschermd tegen licht.
17. Voeg 4 mL PBS toe aan elke buis.
18. Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 300 x g op kamertemperatuur.
19. Verwijder het supernatant door opzuiging en suspendeer de celpellet opnieuw in 0,5 of 1 mL IOTest 3-fixeeroplossing (ref. A07800) bij de werkconcentratie (1X). Zodanig gefixeerd kunnen de bereidingen 24 uur tussen 2 en 8 °C en uit het licht worden bewaard.

PRESTATIES

Prestatiegegevens worden verkregen met de hierboven beschreven procedure op minder dan 24 uur oude bloedmonsters die eerder zijn verzameld in steriele buisjes met EDTA-zout als anticoagulans. De analyse wordt uitgevoerd binnen 2 uur na immunokleuring.

PRECISIE

Het percentage positieve waarden werd bepaald met behulp van volbloed en beenmerg. Elk monster werd 4 maal getest, tweemaal per dag gedurende 1 dag op 2 instrumenten, waarbij gebruik werd gemaakt van 2 batches IntraPrep-permeabilisatiereagens. Metingen (% positief) werden uitgevoerd op de Navios-flowcytometer. Analyse werd uitgevoerd op basis van de CLSI-methode EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Evaluatie van de precisie van kwantitatieve meetmethoden).

Onze acceptatiecriteria zijn afhankelijk van het aantal positieve gebeurtenissen dat voor elke populatie wordt gemeten:

- In het geval van een positieve gebeurtenis <1500, VC <15%
- In het geval van een positieve gebeurtenis >1500, VC <10%

Volbloed-EDTA:

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische zuiverheid							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 8877							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische recovery							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 8877							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloperoxidase-FITC intracytoplasmische kleuring op monocyten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 1070							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloxydase-FITC intracytoplasmische kleuring op granulocyten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 13246							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Volbloed-HEPARINE:

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische zuiverheid							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 6824							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische recovery							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 6824							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloxydase-FITC intracytoplasmische kleuring op monocytten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 961							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloxydase-FITC intracytoplasmische kleuring op granulocyten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 20742							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Volbloed-ACD:

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische zuiverheid							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 12355							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische recovery							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 12355							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloxydase-FITC intracytoplasmische kleuring op monocytten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 1483							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloxydase-FITC intracytoplasmische kleuring op granulocyten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 32715							

	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Beenmerg-EDTA:

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische zuiverheid							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 8808							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14-membraankleuring = lymfocytische recovery							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 8808							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloperoxidase-FITC intracytoplasmische kleuring op monocyten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 2212							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Antimyeloperoxidase-FITC intracytoplasmische kleuring op granulocyten							
Aantal positieve gebeurtenissen (gemiddelde) = 33181							
	Tussen gebruikers	Tussen cytometers	Van dezelfde batch	Tussen batches	Tussen runs	Tijdens run	Totaal
VC (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
RESULTATEN	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

LYMFOCYTISCHE ZUIVERHEID EN RECOVERY

De zuiverheid en recovery van de lymfocyten zijn beoordeeld volgens de aanbevelingen van het CDC (5). Het bloed van 10 gezonde donoren bemonsterd in EDTA, heparine en ACD en 5 beenmergen werden gelabeld met een mengsel van monoklonale antilichamen CD45-FITC en CD14-PE. De gemiddelde waarden van de recovery en de zuiverheid, alsmede het bereik zijn in de volgende tabellen vermeld:

Volbloed-EDTA		
Parameter	Recovery	Zuiverheid
Gemiddelde	93,6	89,7
Min./max.	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Volbloed-HEPARINE		
Parameter	Recovery	Zuiverheid
Gemiddelde	94,3	87,6
Min./max.	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Volbloed-ACD		
Parameter	Recovery	Zuiverheid
Gemiddelde	94,2	94,6
Min./max.	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Beenmerg-EDTA		
Parameter	Recovery	Zuiverheid
Gemiddelde	80,7	71,8
Min./max.	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

BEPERKINGEN

1. Flowcytometrie kan leiden tot verkeerde resultaten indien de cytometer niet perfect is uitgelijnd, indien fluorescentielekken niet juist zijn gecompenseerd en indien de gebieden niet zorgvuldig zijn gepositioneerd.

2. Bepaalde antigene determinanten kunnen gevoelig zijn voor formaldehyde of voor saponine. Elk laboratorium moet de voorwaarden voor het gebruik van monoklonale antilichamen valideren.
3. Nauwkeurige en reproduceerbare resultaten worden verkregen zolang de gebruikte procedures in overeenstemming zijn met de technische brochure en compatibel met goede laboratoriumpraktijken.
4. Dit reagens is geoptimaliseerd om de beste verhouding tussen specifiek en niet-specifiek signaal te bieden. Daarom is het belangrijk dat de verhouding van reagensvolume/aantal leukocyten en erythrocyten in acht wordt genomen bij elke test.
5. In het geval van hypercellulariteit, verdunt u het monster in PBS om minder dan 5×10^9 leukocyten/L en minder dan 6×10^{12} rode bloedcellen/L te verkrijgen (6).
6. In sommige stadia van een aandoening, zoals ernstig nierfalen of hemoglobinoopathiën, kan de ontbinding van rode cellen traag verlopen, onvolledig of zelfs onmogelijk zijn. In dit geval wordt het aanbevolen om cellen met één kern te isoleren met een dichtheidsgradiënt (bijvoorbeeld Ficoll) voorafgaand aan de kleuring (7).

Zie de bijlage voor voorbeelden en referenties.

Handelsmerken

Beckman Coulter, het gestileerde logo en de merken van Beckman Coulter-producten en -services in dit document zijn handelsmerken of gedeponeerde handelsmerken van Beckman Coulter, Inc. in de Verenigde Staten en andere landen.

AANVULLENDE INFORMATIE

Voor patiënten/gebruikers/derden in de EU en in landen met soortgelijke regelgeving (Verordening 2017/746/EU inzake in-vitro diagnostische medische apparaten); als er zich tijdens of als gevolg van het gebruik van dit apparaat een ernstig incident voordoet, dient u dit te melden bij de fabrikant en/of diens bevoegde vertegenwoordiger en bij uw nationale autoriteiten.

REVISIEGESCHIEDENIS

REVISIE AF:	Uitgiftedatum: Januari 2021
REVISIE AW:	
Bijgewerkt om te voldoen aan het wereldwijde etiketteringsbeleid van Beckman Coulter en volgens de vereisten van IVD-R (EU)2017/746:	
Toegevoegde paragrafen	Beoogde gebruiker, Precisie, Lymfocytische recovery en zuiverheid, Aanvullende informatie, Revisiegeschiedenis
Toegevoegde informatie	Zie de paragrafen Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen, Opslag en stabiliteit, Beperkingen
Bijgewerkte paragrafen	Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen, GHS-gevarenclassificatie, Opslag en stabiliteit, Bewijs van bederf, Procedure, Prestaties
Verwijderde paragrafen	Intra-lab reproduceerbaarheid

Verklaring van symbolen

Overzicht met verklaring van symbolen is beschikbaar op beckman.com/techdocs (documentnummer B60062)

	Thuốc thử 1	Thuốc thử 2
	Thuốc thử cố định	Tác nhân thẩm thấu
Công thức	Lông	Lông
Hoạt chất	Formaldehyde	Saponin
Thể tích	5 mL	5 mL
Số lọ	3 lọ	3 lọ
Thể tích trong mỗi xét nghiệm	100 µL	100 µL

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 Missing translation for glossary ID 137326 (150 tests; 6 x 5 mL
2 x 0.1 mL / test)

Dùng để chẩn đoán *In Vitro*

MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG

IntraPrep bao gồm hai thuốc thử sẵn dùng, tạo ra tính thấm trong màng tế bào chất của bạch cầu để chứng minh các yếu tố quyết định kháng nguyên nội bào bằng kháng thể huỳnh quang đơn dòng. IntraPrep được dùng để chuẩn bị mẫu sinh học nhằm phân tích bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy. IntraPrep đã được tối ưu hóa để giảm thiểu việc nhuộm màu không đặc hiệu trong loại phân tích này (1,2,3,4).

NGUYÊN TẮC

Bước đầu tiên, cố định tế bào bằng thuốc thử 1. Sau khi rửa, tạo tính thấm bằng thuốc thử 2 và ly giải số hồng cầu còn lại. Trong giai đoạn này, tế bào được tiếp xúc với kháng thể đơn dòng cộng hợp đặc hiệu cho yếu tố quyết định kháng nguyên nội bào. Sau đó, phân tích bạch cầu bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy.

Tuy nhiên, vẫn có thể chứng minh các yếu tố quyết định kháng nguyên bề mặt. Trong trường hợp này, kháng thể đơn dòng liên hợp đặc hiệu được ủ trước khi cố định.

Máy đếm tế bào dòng chảy đo mức khuếch tán ánh sáng và phát huỳnh quang của các tế bào. Điều này giúp xác định nơi khu trú của quần thể quan tâm trong khung thời gian điện tử trên biểu đồ, tương quan với sự khuếch tán trực giao ánh sáng (Tán xạ góc bên hay SS) và khuếch tán ánh sáng góc hẹp (Tán xạ góc thẳng hay FS). Có thể dùng các biểu đồ khác (kết hợp hai trong các thông số có sẵn trên máy đếm tế bào) để hỗ trợ trong giai đoạn khoanh vùng tùy thuộc vào ứng dụng mà người dùng chọn.

Huỳnh quang của các tế bào đã phân định được phân tích để phân biệt các sự kiện nhuộm dương tính với các sự kiện không nhuộm. Kết quả được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm số sự kiện dương tính so với tất cả sự kiện thu được từ việc khoanh vùng.

ĐỐI TƯỢNG NGƯỜI DÙNG

Sản phẩm này chỉ dùng cho mục đích chuyên môn trong phòng xét nghiệm.

MẪU

Phải lấy mẫu máu tĩnh mạch hoặc tủy xương vào ống vô trùng kháng đông bằng muối EDTA, ACD hoặc heparin.

Phải bảo quản mẫu ở nhiệt độ phòng (18 – 25°C) và không lắc mẫu. Mẫu phải được trộn đều bằng cách khuấy nhẹ trước khi lấy mẫu xét nghiệm.

Phải phân tích các mẫu trong vòng 24 giờ sau khi lấy từ tĩnh mạch.

CẢNH BÁO VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG NGỪA

1. Không dùng thuốc thử đã hết hạn sử dụng.
2. Không làm đông lạnh.
3. Giảm thiểu tiếp xúc với ánh sáng.
4. Tránh làm thuốc thử bị nhiễm khuẩn, nếu không, có thể dẫn đến kết quả sai.
5. Thuốc thử 1 có chứa formaldehyde. Formaldehyde là chất độc hại và gây dị ứng. Chất này được cho là tác nhân gây ung thư.
6. Thuốc thử 2 chứa natri azit (NaN₃). Phải cẩn thận khi xử lý. Không được uống và tránh mọi tiếp xúc với da, niêm mạc và mắt. Ngoài ra, trong môi trường axit, natri azide có thể tạo thành axit hydrazoic tiềm ẩn nguy hiểm. Nếu cần phải thải bỏ, bạn nên pha loãng thuốc thử trong nhiều nước trước khi thải vào hệ thống thoát nước để tránh tích tụ natri azide trong ống kim loại và để tránh nguy cơ nổ.

7. Phải coi tất cả mẫu máu là có nguy cơ lây nhiễm và xử lý cẩn thận (cụ thể: đeo găng tay, mặc áo choàng và đeo kính bảo vệ).
8. Tuyệt đối không dùng pipet bằng miệng và tránh để mẫu tiếp xúc với da, niêm mạc và mắt.
9. Phải bỏ ống máu và vật liệu dùng một lần đã dùng để xử lý trong thùng chứa đặc biệt cho mục đích tiêu hủy.
10. Phải thải bỏ thuốc thử và chất thải theo yêu cầu của địa phương.

PHÂN LOẠI MỐI NGUY HIỂM THEO GHS

Thuốc thử 1: Cố định

NGUY HIỂM



H302	Có hại nếu nuốt phải.
H313	Có thể có hại khi tiếp xúc với da
H314	Gây bỏng da nghiêm trọng và hồng mắt.
H317	Có thể gây ra một phản ứng dị ứng da.
H341	Nghi ngờ gây ra các khuyết tật di truyền.
H350	Có thể gây ung thư.
H370	Gây tổn thương cho các cơ quan.
P201	Xin chỉ dẫn đặc biệt trước khi sử dụng.
P280	Sử dụng găng tay bảo hộ, quần áo bảo hộ và thiết bị bảo vệ mắt/mặt.
P303+P361+P353	NẾU DÍNH TRÊN DA (hoặc tóc): Rửa sạch da bằng nước.
P305+P351+P338	NẾU DÍNH VÀO MẮT: Rửa sạch cẩn thận bằng nước trong vài phút. Tháo kính áp tròng, nếu có và dễ tháo. Tiếp tục rửa sạch.
P310	Gọi ngay bác sĩ hoặc TRUNG TÂM CHỐNG ĐỘC. Methanol 1 - 2% Formaldehyde 5 - 10%



Bảng dữ liệu an toàn có sẵn tại beckman.com/techdocs

BẢO QUẢN VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH

IntraPrep được bảo quản ở 18–25°C.

Độ ổn định của ống chưa mở: thuốc thử ổn định trong 517 ngày.

Độ ổn định của ống đã mở: thuốc thử ổn định trong 90 ngày.

Xem Giấy chứng nhận phân tích theo lô cụ thể tại www.beckman.com.

BẢNG CHỨNG BIẾN CHẤT

Mọi sự biến đổi về vẻ ngoài của thuốc thử có thể là dấu hiệu suy giảm chất lượng và bạn không nên dùng thuốc thử đó.

Để biết thêm thông tin hoặc nếu bạn nhận được sản phẩm bị hỏng, hãy gọi điện cho Dịch vụ khách hàng của Beckman Coulter theo số 8007422345 (Hoa Kỳ hoặc Canada) hoặc liên hệ với Đại diện của Beckman Coulter tại địa phương bạn.

HÀM LƯỢNG

Chất bảo quản natri azit có thể hình thành hợp chất nổ trong ống dẫn bằng kim loại. Xem Thông Báo của Viện quốc gia về an toàn và sức khỏe nghề nghiệp (NIOSH): Explosive Azide Hazard (Nguy cơ nổ azit) (16/8/76).

Để tránh khả năng tích tụ hợp chất azit, hãy xả sạch các ống thải bằng nước sau khi xử lý vớt bỏ thuốc thử chưa pha loãng. Phải xử lý vớt bỏ natri azit theo đúng quy định sở tại.

VẬT LIỆU CẦN DÙNG (KHÔNG KÈM THEO BỘ THUỐC THỬ):

- Ống lấy mẫu và vật liệu cần dùng để lấy mẫu.

- Pipet tự động có đầu hút dùng một lần để lấy mẫu có thể tích 10, 20, 50, 100 và 500 μL .
- Ống chứa mẫu tan huyết bằng nhựa.
- Kháng thể đơn dòng đặc hiệu (mAb).
- Chất kiểm chuẩn âm tính.
- Thuốc thử cố định Leucocyte. Ví dụ: Dung dịch cố định IOTest 3 (Số tham chiếu A07800).
- Dung dịch đệm (PBS: 0,01 Mol natri photphat; 0,145 Mol natri clorua; pH 7,2).
- Máy ly tâm.
- Máy trộn tự động (loại khuấy).
- Máy đếm tế bào dòng chảy.

QUY TRÌNH

A – Nhuộm nội bào

Số lượng tế bào hồng cầu có trong mẫu phải dưới 6×10^6 mỗi μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Pha loãng bằng PBS nếu cần thiết.

Số lượng bạch cầu có trong mẫu cần ít hơn $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Pha loãng bằng PBS nếu cần thiết.

Đối với mỗi mẫu phân tích, ngoài ống xét nghiệm, có thể thêm một ống kiểm chuẩn, trong đó tế bào được trộn với chất kiểm chuẩn âm tính tương ứng với phương pháp nhuộm đặc hiệu đã chọn.

1. Thêm 50 μL mẫu xét nghiệm vào từng ống.
2. Thêm 100 μL thuốc thử 1 vào mỗi ống. Lắc mạnh ngay sau mỗi lần thêm.
3. Ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng ($18\text{--}25^\circ\text{C}$).
4. Thêm 4 mL PBS vào mỗi ống.
5. Quay ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 300 x g tại nhiệt độ phòng.
6. Hút bỏ dịch nổi.
7. Thêm 100 μL thuốc thử 2 vào từng ống. **KHÔNG LẮC** mà hãy để thuốc thử 2 khuếch tán tự nhiên vào viên tế bào.
8. Ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng ($18\text{--}25^\circ\text{C}$) **MÀ KHÔNG LẮC**.
9. Lắc nhẹ bằng tay trong 2 đến 3 giây.
10. Thêm lượng mAb cần thiết (đặc hiệu cho yếu tố quyết định kháng nguyên nội bào) vào từng ống xét nghiệm và nếu cần, hãy thêm lượng kiểm chuẩn âm tính thích hợp vào từng ống kiểm chuẩn.
11. Lắc nhẹ từng ống.
12. Ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng ($18\text{--}25^\circ\text{C}$), tránh ánh sáng.
13. Thêm 4 mL PBS vào mỗi ống.
14. Quay ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 300 x g tại nhiệt độ phòng.
15. Hút bỏ dịch nổi và tái huyền phù viên tế bào trong 0,5 hoặc 1 mL dung dịch cố định IOTest 3 (Số tham chiếu A07800) ở nồng độ làm việc của dung dịch này (1X). Sau khi cố định, có thể bảo quản các chế phẩm trong khoảng từ 2 đến 8°C , tránh ánh sáng trong 24 giờ.

B – Nhuộm trong bào tương và nhuộm màng

Số lượng tế bào hồng cầu có trong mẫu phải dưới 6×10^6 mỗi μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$). Pha loãng bằng PBS nếu cần thiết.

Số bạch cầu trong mẫu phải dưới $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Pha loãng bằng PBS nếu cần thiết.

Đối với mỗi mẫu phân tích, ngoài ống xét nghiệm, có thể thêm một ống kiểm chuẩn, trong đó tế bào được trộn với chất kiểm chuẩn âm tính tương ứng với phương pháp nhuộm đặc hiệu đã chọn.

1. Thêm 50 μL mẫu xét nghiệm vào từng ống.
2. Thêm lượng mAb cần thiết (đặc hiệu cho yếu tố quyết định kháng nguyên màng) vào từng ống xét nghiệm và nếu cần, hãy thêm lượng kiểm chuẩn âm tính thích hợp vào từng ống kiểm chuẩn.
3. Lắc nhẹ từng ống.
4. Ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng ($18\text{--}25^\circ\text{C}$), tránh ánh sáng.
5. Thêm 100 μL thuốc thử 1 vào mỗi ống. Lắc mạnh ngay sau mỗi lần thêm.
6. Ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng ($18\text{--}25^\circ\text{C}$).
7. Thêm 4 mL PBS vào mỗi ống.
8. Quay ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 300 x g tại nhiệt độ phòng.

9. Hút bỏ dịch nổi.
10. Thêm 100 µL thuốc thử 2 vào từng ống. KHÔNG LẮC mà hãy để thuốc thử 2 khuếch tán tự nhiên vào viên tế bào.
11. Ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng (18–25°C) MÀ KHÔNG LẮC.
12. Lắc nhẹ bằng tay trong 2 đến 3 giây.
13. Thêm lượng mAb cần thiết (đặc hiệu cho yếu tố quyết định kháng nguyên nội bào) vào từng ống xét nghiệm và nếu cần, hãy thêm lượng kiểm chuẩn âm tính thích hợp vào từng ống kiểm chuẩn.
14. Thêm 20 µL chất kiểm chuẩn lớp kháng thể vào mỗi ống kiểm chuẩn.
15. Lắc nhẹ từng ống.
16. Ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng (18–25°C), tránh ánh sáng.
17. Thêm 4 mL PBS vào mỗi ống.
18. Quay ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 300 x g tại nhiệt độ phòng.
19. Hút bỏ dịch nổi và tái huyền phù viên tế bào trong 0,5 hoặc 1 mL dung dịch cố định IOTest 3 (Số tham chiếu A07800) ở nồng độ làm việc của dung dịch này (1X). Sau khi cố định, có thể bảo quản các chế phẩm ở 2 đến 8°C, tránh ánh sáng trong 24 giờ.

HIỆU SUẤT

Dữ liệu hiệu suất thu được bằng cách sử dụng quy trình mô tả ở trên với các mẫu máu được thu thập dưới 24 giờ trong các ống vô trùng sử dụng chất kháng đông bằng muối EDTA. Phân tích trong vòng 2 giờ sau khi nhuộm hóa mô miễn dịch.

ĐỘ CHỤM

Xác định giá trị phần trăm dương tính bằng cách sử dụng máu toàn phần và tủy xương. Mỗi mẫu được chạy 4 lần, 2 lần/ngày trong 1 ngày trên 2 thiết bị sử dụng 2 lô thuốc thử thâm thấu IntraPrep. Các phép đo (% dương tính) được thực hiện trên máy đếm tế bào dòng chảy Navios. Tiến hành phân tích dựa trên phương pháp CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Đánh giá hiệu suất độ chụm của phương pháp đo định lượng).

Tiêu chí chấp nhận của chúng tôi phụ thuộc vào số lượng sự kiện dương tính đo được cho mỗi quần thể:

- Nếu sự kiện dương tính <1.500, CV <15%
- Nếu sự kiện dương tính >1.500, CV <10%

Máu toàn phần EDTA:

Nhuộm màng CD45/CD14 = Độ tinh khiết của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 8877							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	2,29	1,82	6,47	2,25	1,65	5,82	7,09
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm màng CD45/CD14 = Khả năng khôi phục của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 8877							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	0,40	1,00	0,81	0,39	0,25	0,65	1,34
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm nội bào trong tế bào chất anti-Myeloperoxidase-FITC trên các bạch cầu đơn nhân							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 1070							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,24	2,37	4,37	1,18	1,19	4,01	5,10
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm bào tương nhuộm trong kháng thể anti-Myeloperoxidase-FITC trên bạch cầu hạt							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 13246							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	0,09	0,03	0,16	0,04	0,03	0,12	0,16
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Máu toàn phần trong HEPARIN:

Nhuộm màng CD45/CD14 = Độ tinh khiết của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 6824							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,33	1,17	2,74	1,65	1,66	1,73	3,40
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm màng CD45/CD14 = Khả năng khôi phục của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 6824							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	2,92	2,40	3,01	0,55	0,64	0,34	3,89
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm nội bào trong tế bào chất anti-Myeloperoxidase-FITC trên các bạch cầu đơn nhân							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 961							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	2,02	0,96	5,17	2,32	3,74	2,94	5,74
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm bào tương ngoài trong kháng thể anti-Myeloperoxidase-FITC trên bạch cầu hạt							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 20742							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,09	1,10	2,46	1,03	1,08	1,92	2,89
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Máu toàn phần trong ACD:

Nhuộm màng CD45/CD14 = Độ tinh khiết của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 12355							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,91	1,60	3,54	1,55	1,35	2,65	4,18
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm màng CD45/CD14 = Khả năng khôi phục của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 12355							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	0,33	0,35	1,06	0,31	0,33	0,95	1,16
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm nội bào trong tế bào chất anti-Myeloperoxidase-FITC trên các bạch cầu đơn nhân							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 1483							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,52	1,27	4,80	1,18	1,51	4,30	5,11
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm bào tương ngoài trong kháng thể anti-Myeloperoxidase-FITC trên bạch cầu hạt							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 32715							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lò	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	0,97	0,85	2,83	0,88	0,79	2,54	3,08
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Tủy xương EDTA:

Nhuộm màng CD45/CD14 = Độ tinh khiết của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 8808							

	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,16	0,89	2,98	0,72	2,32	1,46	3,19
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm màng CD45/CD14 = Khả năng khôi phục của tế bào lympho							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 8808							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	0,37	0,61	1,34	0,31	0,90	0,92	1,50
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm nội bào trong tế bào chất anti-Myeloperoxidase-FITC trên các bạch cầu đơn nhân							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 2212							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	1,97	1,00	4,11	1,00	1,06	3,44	4,34
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Nhuộm bào tương ngoài trong kháng thể anti-Myeloperoxidase-FITC trên bạch cầu hạt							
Số biến cố dương tính (Trung bình) = 33181							
	Giữa những người thao tác	Giữa các máy đếm tế bào	Trong lô	Giữa các lô	Giữa các lần chạy	Trong lần chạy	Toàn phần
CV (%)	0,11	0,29	0,37	0,10	0,13	0,33	0,48
KẾT QUẢ	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ĐỘ TINH KHIẾT VÀ KHẢ NĂNG KHÔI PHỤC CỦA TẾ BÀO LYMPHO

Độ tinh khiết và khả năng khôi phục của tế bào lympho đã được đánh giá theo các khuyến nghị của CDC (5). Mẫu máu của 10 người hiến khỏe mạnh trong EDTA, Heparin và ACD và 5 mẫu tủy xương được đánh dấu bằng hỗn hợp các kháng thể đơn dòng CD45-FITC và CD14-PE. Giá trị trung bình theo khả năng khôi phục và độ tinh khiết cũng như phạm vi được cung cấp trong bảng sau:

Máu toàn phần trong EDTA		
Thông số	Khả năng khôi phục	Độ tinh khiết
Trung bình	93,6	89,7
Tối thiểu/Tối đa	86,1 / 97,6	83,5 / 95,5

Máu toàn phần trong HEPARIN		
Thông số	Khả năng khôi phục	Độ tinh khiết
Trung bình	94,3	87,6
Tối thiểu/Tối đa	84,9 / 97,7	81,5 / 94,3

Máu toàn phần trong ACD		
Thông số	Khả năng khôi phục	Độ tinh khiết
Trung bình	94,2	94,6
Tối thiểu/Tối đa	91,1 / 98,5	87,6 / 97,7

Tủy xương EDTA		
Thông số	Khả năng khôi phục	Độ tinh khiết
Trung bình	80,7	71,8
Tối thiểu/Tối đa	78,3 / 85,8	60,1 / 83,4

GIỚI HẠN

1. Phương pháp đếm tế bào dòng chảy có thể cho kết quả sai nếu điều chỉnh máy đếm tế bào không phù hợp, nếu mức bù huỳnh quang rò rỉ không phù hợp và nếu định vị các vùng không cần thận.
2. Một số yếu tố quyết định kháng nguyên có thể nhạy cảm với formaldehyde hoặc saponin. Mỗi phòng xét nghiệm phải xác nhận các điều kiện sử dụng kháng thể đơn dòng.
3. Sẽ thu được kết quả chính xác và có thể tái lập nếu sử dụng quy trình theo tờ hướng dẫn kỹ thuật và phù hợp với biện pháp xét nghiệm hợp lý.
4. Thuốc thử này đã được tối ưu hóa để cung cấp tỷ lệ tín hiệu đặc hiệu/tín hiệu không đặc hiệu tốt nhất. Do đó, điều quan trọng là phải tuân thủ tỷ lệ thể tích thuốc thử/số lượng bạch cầu và hồng cầu trong mỗi xét nghiệm.

5. Trong trường hợp tăng sinh tế bào, hãy pha loãng mẫu xét nghiệm trong PBS để thu được dưới 5×10^9 bạch cầu/L và dưới 6×10^{12} tế bào hồng cầu/L (6).
6. Trong một số tình trạng bệnh, chẳng hạn như suy thận nặng hoặc bệnh rối loạn máu, hồng cầu có thể ly giải chậm, ly giải không hoàn toàn, hoặc thậm chí là không thể ly giải. Trong trường hợp này, bạn nên phân lập tế bào đơn nhân bằng phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng (ví dụ: Ficoll) trước khi nhuộm (7).

Xem Phụ lục để biết ví dụ và tài liệu tham khảo.

NHÃN HIỆU

Beckman Coulter, logo cách điệu và các nhãn hiệu sản phẩm cũng như dịch vụ của Beckman Coulter nêu trong tài liệu này là nhãn hiệu hoặc nhãn hiệu đã đăng ký của Beckman Coulter, Inc. ở Hoa Kỳ và các quốc gia khác.

THÔNG TIN BỔ SUNG

Đối với bệnh nhân/người dùng/bên thứ ba tại Liên minh Châu Âu và ở các quốc gia có chế độ quản lý giống nhau (Quy định 2017/746/EU về Thiết bị y tế chẩn đoán In vitro); nếu xảy ra sự cố nghiêm trọng trong quá trình sử dụng thiết bị này hoặc do sử dụng thiết bị này, vui lòng báo cáo cho nhà sản xuất và/hoặc đại diện ủy quyền của nhà sản xuất cũng như cơ quan có thẩm quyền tại quốc gia của bạn.

LỊCH SỬ SỬA ĐỔI

PHIÊN BẢN AF:	Ngày phát hành: Tháng 01 năm 2021
PHIÊN BẢN AW:	
Cập nhật để tuân thủ Chính sách ghi nhãn toàn cầu của Beckman Coulter và theo các yêu cầu IVD-R (EU) 2017/746:	
Bổ sung các phần	Đối tượng sử dụng, Độ chụm, Độ tinh khiết và khả năng khôi phục của tế bào lympho, Thông tin bổ sung, Lịch sử sửa đổi
Bổ sung thông tin	Xem các phần Cảnh báo và Biện pháp phòng ngừa, Bảo quản và Độ ổn định, Giới hạn
Các phần cập nhật	Cảnh báo và Biện pháp phòng ngừa, Phân loại mối nguy hiểm theo GHS, Bảo quản và Độ ổn định, Bảng chứng biến chất, Quy trình, Hiệu suất
Các phần bị xóa	Khả năng tái lập trong phòng xét nghiệm

Bảng chú giải các ký hiệu

Danh mục thuật ngữ ký hiệu có sẵn tại beckman.com/techdocs (số tài liệu B60062)

	Реагент 1	Реагент 2
	Бекіту агенті	Өткізгіштік агент
Дәрілік түрі	Сұйықтық	Сұйықтық
Белсенді зат	Формальдегид	Сапонин
Көлем	5 мл	5 мл
Құты саны	3 құтылар	3 құтылар
Сынақ көлемі	100 мкл	100 мкл

IntraPrep Permeabilization Reagent

REF A07803 Missing translation for glossary ID 137326 (150 tests; 6 x 5 mL
2 x 0.1 mL / test)

In Vitro диагностикасында пайдалануға арналған

ПАЙДАЛАНУ МАҚСАТЫ

IntraPrep моноклоналды флуоресцентті антиденелерді пайдалана отырып, жасушаішілік антигендік детерминанттарды көрсету үшін лейкоциттердің цитоплазмалық мембранасының өткізгіштігін индукциялайтын екі дайын реагенттерден тұрады. IntraPrep биологиялық үлгілерді ағын цитометриясы арқылы талдауға дайындау үшін қолданылады. Ол талдаудың осы түрінде спецификалық емес бояуды азайту үшін оңтайландырылған (1, 2, 3, 4).

ҚАҒИДА

Бірінші қадам ретінде жасушалар 1-реагентпен бекітіледі. Жуғаннан кейін 2 реагентпен өткізгіштік индукцияланады және қалған эритроциттер лизиске ұшырайды. Бұл кезеңде жасушалар жасушаішілік антигендік детерминанттарға тән конъюгацияланған моноклоналды антиденелермен байланысқа түседі. Содан кейін лейкоциттер ағын цитометриясы арқылы талданады.

Дегенмен, беттік антигендік детерминанттарды көрсету мүмкін болып қала береді. Бұл жағдайда спецификалық конъюгацияланған моноклоналды антиденелер бекітуге дейін инкубацияланады.

Ағын цитометрі жарық диффузиясы мен жасушалардың флуоресценттенуін өлшейді. Бұл гистограммада анықталған электронды терезеде қызығушылық популяциясын анықтауға мүмкіндік береді, ол жарықтың ортогональды диффузиясын (бүйірлік шашырау немесе SS) және тар бұрышты жарықтың диффузиясын (тікелей шашырау немесе FS) байланыстырады. Цитометрде қолжетімді екі түрлі параметрді біріктіретін басқа гистограммаларды пайдаланушы таңдаған қолданбаға байланысты гейтинг кезеңінде тірек ретінде пайдалануға болады.

Оң боялған оқиғаларды боялмаған оқиғалардан ажырату үшін шектеулі жасушалардың флуоресценттенуіне талдау жүргізілді. Оның нәтижесі оң оқиғалардың гейтинг арқылы алынған барлық оқиғаларға қатынасының пайыздық көрсеткіші ретінде көрсетіледі.

МАҚСАТТЫ ПАЙДАЛАНУШЫ

Бұл өнім зертханалық жағдайда кәсіби пайдалануға арналған.

ҮЛГІЛЕР

Көктамыр қанының немесе сүйек майының үлгілерін антикоагулянт ретінде EDTA тұзы, ACD немесе гепарин бар стерильді түтіктердің көмегімен алу керек.

Үлгілерді бөлме температурасында (18–25°C) сақтау керек және оларды шайқауға болмайды. Үлгіні сынақ үлгісін алмастан бұрын жеңіл араластыру жолымен гомогендеу керек.

Үлгілерді көк тамырды тескен соң 24 сағат ішінде талдау қажет.

ЕСКЕРТУ ЖӘНЕ САҚТЫҚ ШАРАЛАРЫ

1. Жарамдылық мерзімі өткеннен кейін реагентті қолдануға болмайды.
2. Қатыруға болмайды.
3. Жарық әсерін азайтыңыз.
4. Реагенттердің микробтармен ластануына жол бермеңіз немесе жалған нәтижелер орын алуы мүмкін.
5. 1-реагент құрамында формальдегид бар. Формальдегид улы және аллергенді. Ол канцерогенді агент болып саналады.
6. Реагент 2 құрамында натрий азиді бар (NaN₃). Оны мұқият өңдеу керек. Ішке қабылдамаңыз. Теріге, шырышты қабыққа және көзге тиігізбеңіз. Оған қоса, қышқылды ортада натрий азиды ықтимал қауіпті азотты сутек қышқылын түзуі мүмкін. Оны жою қажет болған жағдайда реагентті алдымен судың көп мөлшерінде сұйылтып, артынан кәріз жүйесіне төгуге кеңес беріледі. Осылайша, натрий азидының металл құбырларда жиналуын болдырмай, жарылыс қаупінің алдын алуға болады.

7. Қанның барлық үлгілері ықтимал жұқпалы деп есептелуі және сақтықпен өңделуі (атап айтқанда: қорғаныс қолғабын, халат және көзілдірік кию) керек.
8. Ешқашан оны аузыңызға құймаңыз және үлгілерді теріге, шырышты қабыққа және көзге тигізбеңіз.
9. Өңдеу үшін пайдаланылатын қан түтіктері мен бір реттік материалдарды өртеуге арналған арнайы контейнерлерге тастау керек.
10. Реагенттер мен қалдықтар жергілікті талаптарға сәйкес жойылуы тиіс.

GHS ҚАУІПТЕР КЛАССИФИКАЦИЯСЫ

Реагент 1: Бекіту

ҚАУІП



H302	Жұтылған кезде зиянды.
H313	Теріге тигенде зиянды болуы мүмкін
H314	Терінің қатты күйіп қалуына және көздің зақымдалуына әкеледі.
H317	Терінің аллергиялық реакциясын тудыруы мүмкін.
H341	Генетикалық ақаулар тудырады деген күдік бар.
H350	Қатерлі ісік тудыруы мүмкін.
H370	Мүшелерге зақым келтіреді.
P201	Пайдаланбастан бұрын арнайы нұсқаулар алу қажет.
P280	Қорғаныс қолғабын, қорғаныс киімін және көз/бет қорғанысын киіңіз.
P303+P361+P353	ТЕРІГЕ (немесе шашқа) ТИІП КЕТКЕН ЖАҒДАЙДА: денеңізді сумен шайыңыз.
P305+P351+P338	КӨЗГЕ ТИГЕН ЖАҒДАЙДА: көзіңізді бірнеше минут бойы абайлап сумен жуыңыз. Линза таққан болсаңыз және оларды шешу оңай болса, оларды шешіңіз. Көзіңізді жууды жалғастырыңыз.
P310	ТОКСИКОЛОГИЯЛЫҚ ОРТАЛЫҚҚА немесе дәрігерге/емдеуші дәрігерге дереу қоңырау шалыңыз. Метанол 1 - 2% Формальдегид 5 - 10%



Қауіпсіздік төлқұжаты beckman.com/techdocs мекенжайында қолжетімді

САҚТАУ ЖӘНЕ ТҰРАҚТЫЛЫҚ

IntraPrep 18 – 25°C температурада сақталады.

Жабық құтының тұрақтылығы: реагент 517 күн бойы тұрақты болады.

Ашық құтының тұрақтылығы: реагент 90 күн бойы тұрақты болады.

Нақты топтама бойынша талдау сертификатын мына сайттан қараңыз www.beckman.com.

ЗАҚЫМДАЛУ БЕЛГІЛЕРІ

Реагенттердің сыртқы түрінің кез келген өзгерісі олардың зақымдалғандығын көрсетуі мүмкін және реагентті пайдаланбаған жөн.

Қосымша ақпарат алу үшін немесе зақымдалған өнімді алған жағдайда 800-742-2345 (АҚШ немесе Канада) арқылы Beckman Coulter тұтынушыларға қызмет көрсету орталығына қоңырау шалыңыз немесе жергілікті Beckman Coulter компаниясының өкіліне хабарласыңыз.

МАЗМҰНЫ

Натрий азиді консерванты металдан жасалған құбыр желілерінде жарылғыш қосылыстар түзуі мүмкін. NIOSH Bulletin: Explosive Azide Hazard (8/16/76) (NIOSH бюллетенін қараңыз: азидтердің жарылу қаупі (16.08.1976)).

Азид қосылыстарының ықтимал түзілуін болдырмау үшін сұйылтылмаған реагентті жойғаннан кейін су құбырларын шайыңыз. Натрий азидін жою тиісті жергілікті ережелерге сәйкес жүзеге асырылуы тиіс.

ҚАЖЕТТІ, БІРАҚ ЖИНАҚПЕН БІРГЕ ЖЕТКІЗІЛМЕГЕН МАТЕРИАЛДАР

- Үлгі алу түтіктері және үлгі алу үшін қажетті материал.
- 10, 20, 50, 100 және 500 мкл ерітінділерге арналған бір реттік ұшы бар автоматты тамызғыштар.
- Эритроциттер гемолизіне арналған пластикалық түтіктер.
- Арнайы моноклональды антиденелер (mAb).
- Теріс бақылаулар.
- Лейкоцит фиксация реагенті. Мысалы: IOTest 3 бекіту ерітіндісі (A07800 қараңыз).
- Буфер (PBS: 0,01 М натрий фосфаты; 0,145 М натрий хлориді; рН 7,2).
- Центрифугалау
- Автоматты араластырғыш (араластырғыш түрі).
- Ағын цитометрі.

ПРОЦЕДУРА

А – интрацитоплазмалық бояу

Үлгідегі эритроциттер саны әр мкл ($6 \times 10^{12}/л$) үшін 6×10^6 -дан аз болуы керек. Қажет болса, PBS көмегімен сұйылтыңыз.

Үлгідегі лейкоциттер саны $5 \times 10^3/мкл$ ($5 \times 10^9/л$) аз болуы керек. Қажет болса, PBS көмегімен сұйылтыңыз.

Әрбір талданатын үлгіге түтікке қосымша бір бақылау түтігін қосуға болады, онда ұяшықтар таңдалған арнайы бояуға сәйкес теріс бақылау болған кезде араласады.

1. Әр түтікке сынақ үлгісінің 50 мкл қосыңыз.
2. Әрбір түтікке 100 мкл реагент 1 қосыңыз. Әрбір қосқаннан кейін араластырыңыз.
3. Бөлме температурасында 15 минут бойы инкубациялаңыз ($18-25^{\circ}C$).
4. Әр түтікке 4 мл PBS ерітіндісін қосыңыз.
5. 300 x г шамасында 5 минут бойы бөлме температурасында центрифугалаңыз.
6. Супернатантты аспирация көмегімен алып тастаңыз.
7. Әр түтікке 100 мкл реагент 2 қосыңыз. АРАЛАСТЫРМАҢЫЗ, 2-реагентті табиғи жолмен жасуша түйіршіктеріне диффузиялау үшін қалдырыңыз.
8. Бөлме температурасында ($18-25^{\circ}C$) 5 минут бойы ШАЙҚАМАЙ инкубациялаңыз.
9. 2–3 секунд бойы қолмен баяу шайқаңыз.
10. Әрбір пробиркаға қажетті mAb мөлшерін (интрацитоплазмалық антигендік детерминантқа тән) қосыңыз және қажет болған жағдайда әрбір сынақ түтігіне теріс бақылаудың тиісті мөлшерін қосыңыз.
11. Түтікшені ақырын араластырыңыз.
12. Жарықтан қорғалған бөлме температурасында ($18-25^{\circ}C$) 15 минут инкубациялаңыз.
13. Әр түтікке 4 мл PBS ерітіндісін қосыңыз.
14. 300 x г шамасында 5 минут бойы бөлме температурасында центрифугалаңыз.
15. Супернатантты аспирация көмегімен алып тастаңыз да, IOTest 3 бекіту ерітіндісінің (A07800 қараңыз) 0,5–1 мл мөлшеріндегі жасуша түйіршіктерін өзінің жұмыс концентрациясына (1X) қайта ерітіңіз. Осылайша бекітілген препараттарды 2 және $8^{\circ}C$ аралығында жарықтан алыс жерде 24 сағат бойы сақтауға болады.

В – интрацитоплазмалық және мембраналық бояу

Үлгідегі эритроциттер саны әр мкл ($6 \times 10^{12}/л$) үшін 6×10^6 -дан аз болуы керек. Қажет болса, PBS көмегімен сұйылтыңыз.

Үлгідегі лейкоциттер саны 5×10 -нан аз болуы керек³/мкл ($5 \times 10^9/л$). Қажет болса, PBS көмегімен сұйылтыңыз.

Әрбір талданатын үлгіге түтікке қосымша бір бақылау түтігін қосуға болады, онда ұяшықтар таңдалған арнайы бояуға сәйкес теріс бақылау болған кезде араласады.

1. Әр түтікке сынақ үлгісінің 50 мкл қосыңыз.

2. Әрбір пробиркаға қажетті mAb мөлшерін (мембраналық антигендік детерминантқа тән) қосыңыз және қажет болған жағдайда әрбір сынақ түтігіне теріс бақылаудың тиісті мөлшерін қосыңыз.
3. Түтікшені ақырын араластырыңыз.
4. Жарықтан қорғалған бөлме температурасында (18–25°C) 15 минут инкубациялаңыз.
5. Әрбір түтікке 100 мкл реагент 1 қосыңыз. Әрбір қосқаннан кейін араластырыңыз.
6. Бөлме температурасында 15 минут бойы инкубациялаңыз (18–25°C).
7. Әр түтікке 4 мл PBS ерітіндісін қосыңыз.
8. 300 x г шамасында 5 минут бойы бөлме температурасында центрифугалаңыз.
9. Супернатантты аспирация көмегімен алып тастаңыз.
10. Әр түтікке 100 мкл реагент 2 қосыңыз. АРАЛАСТЫРМАҢЫЗ, 2-реагентті табиғи жолмен жасуша түйіршіктеріне диффузиялау үшін қалдырыңыз.
11. Бөлме температурасында (18–25°C) 5 минут бойы ШАЙҚАМАЙ инкубациялаңыз.
12. 2–3 секунд бойы қолмен баяу шайқаңыз.
13. Әрбір пробиркаға қажетті mAb мөлшерін (интрацитоплазмалық антигендік детерминантқа тән) қосыңыз және қажет болған жағдайда әрбір сынақ түтігіне теріс бақылаудың тиісті мөлшерін қосыңыз.
14. Әрбір басқару түтігіне 20 мкл изотиптік бақылау қосыңыз.
15. Түтікшені ақырын араластырыңыз.
16. Жарықтан қорғалған бөлме температурасында (18–25°C) 15 минут инкубациялаңыз.
17. Әр түтікке 4 мл PBS ерітіндісін қосыңыз.
18. 300 x г шамасында 5 минут бойы бөлме температурасында центрифугалаңыз.
19. Супернатантты аспирация көмегімен алып тастаңыз да, IOTest 3 бекіту ерітіндісінің (A07800 қараңыз) 0,5–1 мл мөлшеріндегі жасуша түйіршіктерін өзінің жұмыс концентрациясына (1X) қайта ерітіңіз. Осылайша бекітілген препараттарды 2 және 8°C аралығында жарықтан алыс жерде 24 сағат бойы сақтауға болады.

ӨНІМДІЛІК

Өнімділік жөніндегі деректер 24 сағаттық үлгілерді пайдаланып, жоғарыда сипатталған процедура арқылы алынады. Бұл үлгілер алдын ала антикоагулянт ретінде EDTA тұзы арқылы стерильді түтіктерге жиналады. Талдау иммундық бояудан соң 2 сағат ішінде жасалады.

ДӘЛДІК

Оң мәндердің пайызы жаңа алынған қан мен жілік майын қолдану арқылы анықталды. Әрбір үлгі IntraPrep өткізгіштік реагентінің 2 партиясын пайдаланып 2 аспапта 1 күн бойы күніне екі рет 4 рет талданды. Өлшемдер (% оң) Navios ағын цитометрінде жүргізілді. Талдау CLSI EP5-A2 әдісі негізінде жүргізілді: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (Сандық өлшеу әдістерінің дәлдік өнімділігін бағалау).

Біздің қабылдау критерийлері әрбір популяция үшін өлшенген оң оқиғалардың санына байланысты:

- Оң оқиға болса <1500, CV <15%
- Оң оқиға болса >1500, CV <10%

Жаңа алынған қан EDTA:

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық тазалық							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 8877							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	2.29	1.82	6.47	2.25	1.65	5.82	7.09
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық қалпына келтіру							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 8877							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	0.40	1.00	0.81	0.39	0.25	0.65	1.34
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Моноциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 1070							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы

CV (%)	1.24	2.37	4.37	1.18	1.19	4.01	5.10
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Гранулоциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 13246							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	0.09	0.03	0.16	0.04	0.03	0.12	0.16
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Жаңа алынған қан ГЕПАРИН:

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық тазалық							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 6824							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	1.33	1.17	2.74	1.65	1.66	1.73	3.40
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық қалпына келтіру							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 6824							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	2.92	2.40	3.01	0.55	0.64	0.34	3.89
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Моноциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 961							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	2.02	0.96	5.17	2.32	3.74	2.94	5.74
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Гранулоциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 20742							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	1.09	1.10	2.46	1.03	1.08	1.92	2.89
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Жаңа алынған қан Созылмалы ауру анемиясы (ACD):

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық тазалық							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 12355							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	1.91	1.60	3.54	1.55	1.35	2.65	4.18
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық қалпына келтіру							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 12355							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	0.33	0.35	1.06	0.31	0.33	0.95	1.16
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Моноциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 1483							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	1.52	1.27	4.80	1.18	1.51	4.30	5.11
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Гранулоциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 32715							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	0.97	0.85	2.83	0.88	0.79	2.54	3.08
НӨТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

EDTA жілік майы:

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық тазалық							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 8808							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	1.16	0.89	2.98	0.72	2.32	1.46	3.19
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

CD45/CD14 мембраналық бояу = Лимфоцитарлық қалпына келтіру							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 8808							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	0.37	0.61	1.34	0.31	0.90	0.92	1.50
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Моноциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 2212							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	1.97	1.00	4.11	1.00	1.06	3.44	4.34
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Гранулоциттердегі антимиелопероксидаза-FITC интрацитоплазмалық бояу							
Оң оқиғалар саны (Орташа мән) = 33181							
	Аралық оператор	Цитометраралық	Топтама ішілік	Топтама аралық	Жүгіру арасында	Жүгіру ішінде	Жалпы
CV (%)	0.11	0.29	0.37	0.10	0.13	0.33	0.48
НӘТИЖЕЛЕР	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

ЛИМФОЦИТТЫҚ ТАЗАЛЫҚ ЖӘНЕ ҚАЛПЫНА КЕЛУ

Лимфоциттердің тазалығы мен қалпына келуі CDC ұсыныстарына сәйкес бағаланды (5). EDTA, гепарин және Созылмалы ауру анемиясы (ACD) сынамалары алынған 10 сау донордың қаны және 5 сүйек майы CD45-FITC және CD14-PE моноклоналды антиденелерінің қоспасымен белгіленді. Қалпына келтіру мен тазалықтың орташа мәндері, сондай-ақ ауқымы келесі кестелерде берілген:

Жаңа алынған қан EDTA		
Параметр	Қалпына келтіру	Тазалық
Орташа	93.6	89.7
мин/макс	86.1 / 97.6	83.5 / 95.5

Жаңа алынған қан ГЕПАРИН		
Параметр	Қалпына келтіру	Тазалық
Орташа	94.3	87.6
мин/макс	84.9 / 97.7	81.5 / 94.3

Жаңа алынған қан Созылмалы ауру анемиясы (ACD)		
Параметр	Қалпына келтіру	Тазалық
Орташа	94.2	94.6
мин/макс	91.1 / 98.5	87.6 / 97.7

EDTA жілік майы		
Параметр	Қалпына келтіру	Тазалық
Орташа	80.7	71.8
мин/макс	78.3 / 85.8	60.1 / 83.4

ШЕКТЕУЛЕР

1. Цитометр дұрыс бапталмаған, флуоресценттенудің ағып кетуі дұрыс өтелмеген және аймақтар мұқият орналастырмаған жағдайда, ағын цитометриясы қате нәтижелер беруі мүмкін.
2. Кейбір антигендік детерминанттар формальдегидке немесе сапонинге сезімтал болуы мүмкін. Әрбір зертхана моноклоналды антиденелерді қолдану шарттарын тексеруі керек.
3. Жүргізілген процедуралар техникалық нұсқау брошюрасына сәйкес және тиісті зертханалық тәжірибемен үйлесімді болған жағдайда ғана дұрыс, әрі жаңғыртылуы мүмкін нәтижелерді алуға болады.
4. Бұл реагент ең жақсы спецификалық/спецификалық емес сигнал қатынасын қамтамасыз ету үшін оңтайландырылған. Сондықтан әрбір сынақта реагент көлемінің/лейкоциттер мен эритроциттер санының арақатынасын сақтау маңызды.

5. Гипержасушалылық жағдайында сынама үлгіні 5×10^9 лейкоцит/л және 6×10^{12} эритроцит/л аз алу үшін PBS-те сұйылтыңыз (6).
6. Кейбір жіті бүйрек жеткіліксіздігі немесе гемоглобинопатия сияқты аурулар жағдайында, эритроциттер лизисі баяу, толық емес немесе тіпті мүмкін емес болуы мүмкін. Бұл жағдайда бояудан бұрын (7) тығыздық градиентін (мысалы, Ficoll) пайдаланып, моноклеарлы жасушаларды оқшаулап алу ұсынылады.

Мысалдар мен анықтамалар алу үшін қосымшаны қараңыз.

САУДА БЕЛГІЛЕРІ

Beckman Coulter, стильденген логотип, сонымен қатар Beckman Coulter өнім мен қызмет көрсету белгілері — бұл АҚШ және басқа елдердегі Beckman Coulter, Inc. сауда белгілері немесе тіркелген сауда белгілері.

ҚОСЫМША АҚПАРАТ

Еуропалық Одақтағы және бірдей реттеу режимі (зертханалық жағдайдағы медициналық диагностикалық құрылғылар туралы 2017/746/ЕО қаулысы) бар елдердегі пациент/пайдаланушы/үшінші тарап үшін; егер осы құрылғыны пайдалану кезінде немесе оны пайдалану нәтижесінде елеулі оқиға орын алса, өндірушіге және/немесе оның уәкілетті өкіліне және ұлттық органыңызға хабарлаңыз.

Өзгерту тарихы

AF ҚАЙТА ҚАРАУ:	Шығарылған күні: Қаңтар 2021
AW РЕДАКЦИЯСЫ:	
Beckman Coulter ғаламдық таңбалау саясатына және IVD-R (EO) 2017/746 талаптарына сәйкес жасалған жаңартулар:	
Қосылған бөлімдер	Мақсатты пайдаланушы, дәлдік, лимфоциттердің қалпына келуі және тазалығы, қосымша ақпарат, Өзгерту тарихы
Қосылған ақпарат	Ескерту және сақтық шаралары, Сақтау және тұрақтылық, Шектеулер тарауларын қараңыз
Жаңартылған бөлімдер	Ескерту және сақтық шаралары, GHS қауіптер классификациясы, сақтау және тұрақтылық, Зақымдалу белгілері, процедура, өнімділік
Жойылған бөлімдер	Зертханаішілік жаңғыртылу мүмкіндігі

Таңбалар пернесі

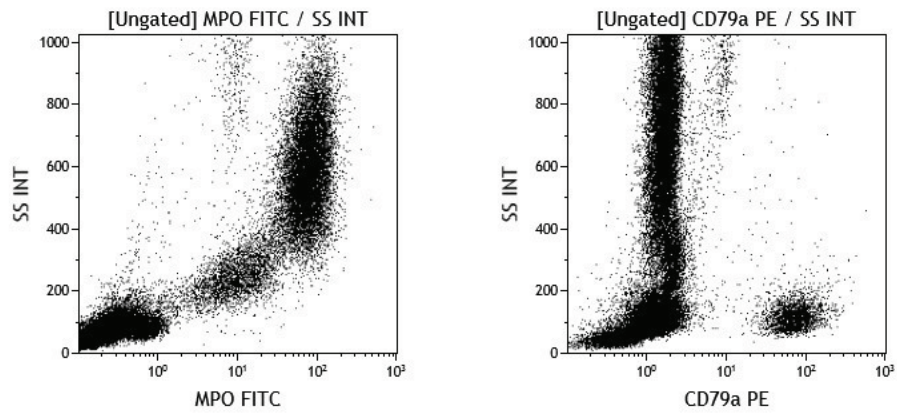
Таңбалар глоссарийі beckman.com/techdocs сайтында (құжат нөмірі: B60062) қолжетімді

APPENDIX

- EXAMPLES

The graphs below are ungated biparametric representations (Side Scatter vs Fluorescence Intensity) of normal whole blood sample. Intracellular staining is with Anti-Myeloperoxidase-FITC (MPO-FITC) conjugated monoclonal antibody and with CD79a-PE conjugated monoclonal antibody.

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



REFERENCES

1. Campana, D., Thompson, J.S., Amlot, P., Brown, S., Janossy, G., "The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage", 1987, *J. Immunol.*, 138, 648-655.
2. Koeffler, H.P., Ranyard, J., Pertcheck, M., "Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation", 1985, *Blood*, 65, 484-491.
3. Picker, L.J., Singh, M.K., Zdraveski, Z., Treer, J.R., Waldrop, S.L., Bergstresser, P.R., Maino, V.C., "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry", 1995, *Blood*, 86, 1408-1419.
4. Lees, O., "Immunophénotypage des cellules sanguines : du prélèvement à la lecture au cytomètre : les différentes méthodes", 1996, *Revue Française des Laboratoires*, 287, 33-39.
5. Nicholson, J.K.A., Hearn, T.L., Cross, G.D., White, M.D., "1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV)", 1997, *MMWR* 46, RR-21-29.
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.

IMMUNOTECH SAS 是贝克曼库尔特公司的旗下公司, 地址: 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, 电话: +(33) 4 91 17 27 27

www.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

製造販売業者: ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063

東京都江東区有明三丁目5番7号

TOC有明ウエストタワー

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.

Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



IMMUNOTECH SAS A Beckman Coulter Company, 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, +(33) 4 91 17 27 27

www.beckman.com