

PeliCluster CD62P

Monoclonal mouse anti-human reagents for identification of cells expressing CD62P antigen.

Form	REF	Clone
FITC	M2187	AK6
PE	M1706	CLB-thromb/6, C2

X0033-498eng 1902091159



1. INTENDED USE

The PeliCluster antibodies are intended for in vitro diagnostic use. The reagents identify and enumerate cells expressing the CD antigen using a flow cytometer for analysis. To prevent interference with red cells during analysis, treatment of whole blood with lysing reagent (PeliLyse A1, order number M7101.6) is recommended. The flow cytometer must be equipped to detect light scatter and the appropriate fluorescence, and be equipped with the appropriate software for data acquisition and analysis. Refer to your instrument user's guide for instructions.

Applications

Detection of activated platelets. Thrombus imaging.
Immunohistological investigation of endothelial cell function.

2. COMPOSITION

Clone AK-6 is of a mouse IgG1 subclass. The antibody was submitted to CD62P in the Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. The antibody is conjugated with fluorescein iso-thiocyanate isomer 1 (FITC). The molecular F/P ratio is between 5 and 10.

Clone CLB-thromb/6, C2, has been derived from hybridisation of SP2/O Ag14 cells with spleen cells of a (BALB/c x A/J) mouse immunised with human platelets. This clone is of a mouse IgG1 subclass. The antibody was submitted to CD62P in the Fourth, Fifth and Sixth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. The antibody is conjugated with R-phycoerythrin (PE). The molecular F/P ratio is between 1.0 – 2.0.

The antibodies were purified from ascites or tissue culture medium using column chromatography (ion exchange and/or affinity chromatography).

Reagent contents.

The reagents are supplied in 1 ml of 20 mM TRIS plus 150 mM NaCl, pH 8.0, or phosphate buffered saline (PBS), containing BSA or another stabilising protein and NaN₃ 0,1% (w/v) as preservative (see table 1).

Table 1. Contents of bottles

FITC	100 tests per ml in PBS
PE	100 tests per ml in TRIS

WARNING:

Sodium azide is harmful if swallowed (R22). Keep out of reach of children (S2). Keep away from food, drink, and animal feedingstuff (S13). Wear suitable protective clothing (S36). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S46). Contact with acids liberates very toxic gas (R32). Azide compounds should be flushed with large volumes of water during disposal to avoid deposits in lead or copper plumbing where explosive conditions can develop.

3. STORAGE AND HANDLING

The antibody reagent is stable until the expiration date shown on the label when stored at 2 to 8°C. Do not use after the expiration date. Do not freeze the reagent or expose it to direct light during storage or incubation with cells. Keep the outside of the reagent vial dry. Reagents should not be used if any evidence of deterioration, such as increase in

compensation, or substantial loss of reactivity is observed.

4. REAGENTS OR MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Lysing solution (PeliLyse, order number M7101.6).
- Wash and dilution buffer for mononuclear cells, Phosphate Buffered Saline, containing 0.2% BSA (w/v); PBS/BSA.
- Wash and dilution buffer for platelets, Sequestre buffer (Seq), storage 1 month at 2 to 8°C. 10 x stock solution, dissolve in 1 litre of distilled water:
Na₂HPO₄·H₂O : 31.3 g
Na₂EDTA·2H₂O : 33.3 g
NaCl : 90.0 g
Prior to use dilute in distilled water, add BSA till final concentration of 0.2% (w/v). Mix and adjust pH to 6.8.
- Fixation buffer, PFA/BSA (*): Para-Formaldehyde 1% in PBS, containing 0.2% BSA (pH 7.2).
- Microwell plates (96 wells, V bottom) or plastic flow cytometry tubes.
- Flow cytometer. Refer to the appropriate instrument user's guide for information.

(*) The procedure employs a fixative, formaldehyde. Contact is to be avoided with skin or mucous membranes.

5. SPECIMEN(S)

Blood samples can be prepared for flow cytometric analysis by using PBMC preparation procedures. PBMC preparation yield more technique-dependent results (1).

Collect blood aseptically by venipuncture (1,2) into sterile K₂EDTA blood collection tube. A minimum of 1 ml of whole blood is required for the whole blood method and a minimum of 2 ml of whole blood is required for PBMC preparation. Store anticoagulated blood at room temperature (18 to 25°C).

WARNING:

Consider all biological specimens and materials which come in contact with them as biohazardous. Specimens should be handled as potentially infectious (3,4) and disposed in accordance with federal, state and local regulations. Do not pipet by mouth. Wear suitable protective clothing and gloves. Fixation has been reported to inactivate HIV (5).

6. PROCEDURES

A: Method with ficoll purified cells

- 1 Prepare a mononuclear cell suspension with a concentration of 1 x 10⁷ cells/ml.
- 2 Add 40 µl of cell suspension to microtiter wells or tubes.
- 3 Add 10 µl of the undiluted antibody to the microtiter wells or tubes and mix gently.
- 4 Incubate for 30 minutes at 2 to 8°C.
- 5 Add 150 µl buffer to the microtiter wells or 2 ml buffer to the tubes and centrifuge at 500 x g for 5 minutes.
- 6 Aspirate the supernatant from the cell pellet and resuspend the cells.
- 7 Add 200 µl buffer to the microtiter wells or 2 ml buffer to the tubes and centrifuge at 500 x g for 5 minutes.
- 8 Aspirate the supernatant from the cell pellet and resuspend the cells.
- 9 Flowcytometer analysis:
Add 200 µl buffer to the microtiter wells and transfer this final cell suspension to appropriate test tubes, or add 200 µl buffer to the tubes.
- 10 If analysis within 8 hours is not possible add at no. 9, instead of buffer, 200 µl PFA 1%. Sanquin Reagents recommends then analysing within 24 hours.

B: Whole blood method

- 1 Draw blood into a blood collection tube containing EDTA.
- 2 Deliver 100 µl (*) of well mixed whole blood to the bottom of the test tube.
- 3 Add 10 µl of the undiluted antibodies to the bottom of the test tube, and mix firmly during 30 seconds.
- 4 Incubate for 15 to 30 minutes at room temperature.
- 5 Mix the tubes and add 2 ml of lysing solution (PeliLyse A1, 10x diluted).
- 6 Incubate for 10 to 15 minutes at room temperature until lysing is complete.
- 7 Analyse the samples within 90 minutes.

If analysis within 90 minutes is not possible, centrifuge the tubes at 500x g for 5 minutes. Aspirate the supernatant from the cell pellet and resuspend the cells in 1 ml buffer when analysed within 8 hours or in 1 ml PFA 1%. Sanquin Reagents recommends then analysing within 24 hours.

* This method was developed for blood samples with a normal white count with the use of PeliLyse A1 (lysing solution, order number M7101.6). It may be necessary to adjust the quantity of blood for samples with very high or low white count.

C: Platelet membrane flow cytometry and microscopy.

1. Transfer 45 µl of platelet suspension into the microwell plate or tubes and add 5 µl monoclonal antibody*. Mix gently and incubate for 30 minutes at 2 to 8°C.
2. Wash by mixing and adding Seq to the microwell plate (1st wash 150 µl, 2nd wash 200 µl) or tubes (2 ml). Centrifuge at 1000 x g for 5 minutes and aspirate the supernatant, repeat this procedure once more.
3. Prepare cells for analysis:
For flow cytometry, resuspend the cells by adding 200 µl Seq to the microwell plate or tubes. If a microwell plate was used the contents are transferred to appropriate tubes.
For fluorescence microscopy, resuspend the cells in 50 µl embedding medium, transfer cells to a microscope slide and place a cover glass.

* In general, 5 µl undiluted monoclonal antibody can be used. Alternatively an optimal dilution can be determined. To determine background fluorescence always use a negative control from the same isotype.

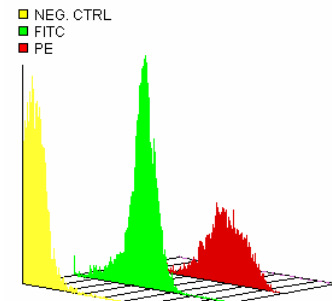
Analytical Results

Abnormal number of cells expressing this antigen or aberrant expression levels of the antigen can be expected in some disease states. It is important to understand the normal expression pattern for this antigen and its relationship to expression of other relevant antigens in order to perform appropriate analysis.

Flow cytometry

Vortex the cells thoroughly at low speed to reduce aggregation before running the cells on the flow cytometer (6). Acquire and analyse list-mode data using appropriate software. Before acquiring samples, adjust the threshold to minimise debris and ensure populations of interest are included. Fig 1 displays representative data performed on gated lymphocytes. Laser excitation is at 488 nm.

Fig. 1: Fluorescence profile, scatter gates set on activated platelets (R1)



NOTE: Improper gate setting on the sample data can give incorrect results.

Internal Quality Control

The use of a negative control (see Sanquin Reagents catalogue) is recommended to determine background fluorescence produced due to Fc binding capacities by mononuclear cells. The concentration and F/P ratio of these controls have been adjusted to the conjugated monoclonal antibodies of Sanquin Reagents.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS Specificity

The monoclonal antibody is directed against the CD62P antigen (P-selectin, GMP-140 or PADGEM), which is expressed on megakaryocytes, endothelial cells and in platelet alpha granules and is translocated to the platelet surface upon activation with strong agonists (molecular mass 140 kDa). A similar protein, derived from endothelial cell Weibel-Palade bodies, is transiently expressed on the surface of activated endothelial cells. (7-10).

Sensitivity

Sensitivity is defined as a resolution of the CD negative population from the different CD positive population. Sensitivity was measured by evaluating a range of antibody concentrations. Each concentration was tested on whole blood. The separation of CD positive from CD negative was determined from each sample and averaged within each concentration. The bottled antibody

concentration for each reagent provided optimum sensitivity in resolving the CD positive cells from the negative.

Reproducibility/Repeatability.

The CDs were submitted in one of the International Workshops on Human Leukocyte Differentiation Antigens or meet the Workshop specifications (see composition).

To determine the repeatability of staining with each reagent, samples were stained with multiple lots of reagents. The different samples used in the evaluation provided an average mean fluorescence intensity (MFI) value as shown in table 2. For each sample, two different lots of reagents generated a pair of results. Individual SDs were determined from the paired results for each sample. The SDs were combined to derive a pooled SD for each reagent that provides an estimate of within-sample repeatability.

Table 2. Repeatability of mean fluorescence intensity (MFI) of target cells across different lots (N) and across multiple donors.

	N*	Average MFI	Pooled SD	Pooled %CV
FITC	1	74.72	0.40	0.54%
PE	4	317.6	69.5	21.9%

* N = number of samples

8. LIMITATIONS

Conjugates with brighter fluorochromes (PE, PE-Cy5) will give a greater separation than those with other dyes (FITC). When populations overlap, calculation of the percentage positive for the markers can be affected by choice of fluorochrome.

Use of monoclonal antibodies in patient treatment can interfere with recognition of target antigens by this reagent. This should be considered when analysing samples from patients treated in this fashion. Sanquin Reagents has not characterised the effect of the presence of therapeutic antibodies on the performance of this reagent. Single reagents can provide only limited information in the analysis of leukaemia and lymphomas. Using combination of other reagents and application of other diagnostic procedures may provide more information than application of these reagents only. Multicolour analysis using relevant combination of reagents is highly recommended.

As reagents can be used in different combinations, laboratories need to become familiar with the properties of each antibody in conjunction with other markers in normal and abnormal samples.

Reagent data performance was collected typically with EDTA-treated blood. Reagent performance can be affected by the use of other anticoagulants.

TROUBLESHOOTING

Problem	Possible Cause	Solution
Poor resolution between debris and lymphocytes	Cell interaction with other cells and platelets Rough handling of cell preparation Inappropriate instrument settings	Prepare and stain another sample. Check cell viability; centrifuge cells at lower speed. Follow proper instrument set-up procedures; optimise instrument settings as required.
Staining dim or fading	Cell concentration too high at staining step Insufficient reagent Cells not analysed within 8 hours of staining Improper medium preparation (preservative omitted)	Check and adjust cell concentration or sample volume; stain with fresh sample Repeat staining with increased amount of antibody. Repeat staining with fresh sample; analyse promptly. Use preservative in staining medium and washing steps.
Few or no cells	Cell concentration too low Cytometer malfunction	Resuspend fresh sample at a higher concentration ; repeat staining and analysis. Troubleshoot instrument.

REFERENCES

- 1 *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.
- 2 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition;Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.
- 3 *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.
- 4 Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.
- 5 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.
- 6 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC; American Society for Microbiology; 1986:226-235.
- 7 Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.*, 175, 1147-50 (1992).
- 8 Skinner, M.P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164,73-76 (1989).
- 9 Skinner, M.P. et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 5371-74 (1991).
- 10 Modderman, P.W. et al., *Leucocyte Typing IV*, 1038 (1989).

PE	4	317.6	69.5	21.9%
----	---	-------	------	-------

* N = Anzahl der Proben

8. EINSCHRÄNKUNGEN

Konjugate mit helleren Fluoreszenzfarbstoffen (PE, PE-Cy5) ergeben eine bessere Unterscheidung als beispielsweise bei der Verwendung von FITC. Bei Überlappung der

Populationen kann die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes Einfluss auf die Berechnung des prozentualen Positivanteils für die Marker haben.

Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern zur Behandlung von Patienten kann die Erkennung des Zielantigens durch dieses Reagenz beeinflussen. Dies muss bei der Analyse entsprechender Patientenproben berücksichtigt werden. Der Einfluss des Vorhandenseins therapeutischer Antikörper auf die Leistung dieses Reagenz wurde von Sanquin Reagents nicht bestimmt. Einzelne Reagenzien sind bei der Analyse von Leukämien und Lymphomen nur von begrenzter Aussagekraft. Eine Kombination mit anderen Reagenzien und die Verwendung anderer diagnostischer Verfahren sind möglicherweise informativer als die ausschließliche Verwendung dieser Reagenzien. Es wird dringend die Mehrfarbenanalyse mit Hilfe einer geeigneten Kombination von Reagenzien empfohlen.

Da Reagenzien in unterschiedlichen Kombinationen verwendet werden können, müssen die Labors mit den Eigenschaften eines jeden Antikörpers in Verbindung mit anderen Markern bei normalen und anomalen Proben vertraut sein.

Die Daten über die Leistung der Reagenzien wurden in der Regel anhand von mit EDTA-behandeltem Blut gewonnen. Die Verwendung anderer Antikoagulanzen kann die Leistung der Reagenzien beeinträchtigen.

FEHLERSUCHE

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Schlechte Unterscheidung zwischen Verunreinigung und Lymphozyten	Wechselwirkung der Zellen mit anderen Zellen und Thrombozyten Zellpräparat wurde nicht sorgfältig genug behandelt. Ungeeignete Geräteeinstellungen	Färbung mit anderer Probe wiederholen. Lebensfähigkeit der Zellen überprüfen; Zellen bei geringerer Geschwindigkeit zentrifugieren. Anleitung zur Inbetriebnahme des Geräts beachten; Geräteeinstellung gegebenenfalls optimieren.
schwache oder verblassende Färbung	Zellkonzentration beim Anfärbeschritt zu hoch Reagenzmenge nicht ausreichend. Zellen wurden nicht innerhalb von 8 Stunden nach dem Anfärben analysiert. Falsche Präparation des Mediums (es wurde kein Konservierungsmittel verwendet)	Zellkonzentration oder Probenvolumen überprüfen und korrigieren; Färbung mit neuer Probe wiederholen. Färbung mit einer größeren Menge Antikörper wiederholen. Färbung mit frischer Probe wiederholen; sofort analysieren. Im Färbemedium und bei den Waschschritten Konservierungsmittel verwenden.
Wenige oder gar keine Zellen vorhanden	Zellkonzentration ist zu gering. Fehlfunktion des	Frische Probe in einer höheren Konzentration resuspendieren; Färbung und Analyse wiederholen. Fehlersuche beim Gerät

	Durchflusszytometer.	durchführen.
--	----------------------	--------------

QUELLENANGABE

1 *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.

2 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition;Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.

3 *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.

4 Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. MMWR. 1988;37:377-388.

5 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.

6 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC; American Society for Microbiology; 1986:226-235.

7 Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.*, 175, 1147-50 (1992).

8 Skinner, M.P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164,73-76 (1989).

9 Skinner, M.P. et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 5371-74 (1991).

10 Modderman, P.W. et al., *Leucocyte Typing IV*, 1038 (1989).

PeliCluster CD62P

Réactifs monoclonaux murins anti-humains pour l'identification des cellules exprimant l'antigène CD62P.

Forme	REF	Clone
FITC	M2187	AK6
PE	M1706	CLB-thromb/6, C2

X0033-498fra 1902091159



1. INDICATION

Les anticorps PeliCluster sont conçus pour le diagnostic in vitro. Les réactifs identifient et énumèrent les cellules exprimant l'antigène CD sur cytomètre de flux. Pour éviter toute interférence avec les globules rouges pendant l'analyse, le traitement du sang complet par réactif de lyse est recommandé (PeliLyse A1, numéro de commande M7101.6). Le cytomètre de flux doit être équipé pour détecter la diffusion de la lumière et la fluorescence appropriée et équipé du logiciel adéquat d'acquisition et d'analyse des données. Se référer au manuel d'utilisation de l'instrument.

Applications

Détection des plaquettes activées. Imagerie du thrombus. Étude immunohistologique des fonctions des cellules endothéliales.

2. COMPOSITION

Le clone AK-6 appartient à une sous-classe d'IgG1 murines. L'anticorps a été soumis à CD62P lors du 5^e Atelier international sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains (Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens). L'anticorps est conjugué à l'isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le rapport molaire F/P est compris entre 5 et 10.

Le clone CLB-thromb/6, C2 a été dérivé par hybridation de cellules SP2/O Ag14 avec des cellules de rate d'une souris (BALB/c x A/J) immunisée avec des plaquettes humaines. Ce clone appartient à une sous-classe d'IgG1 murines. L'anticorps a été soumis à CD62P lors du 5^e Atelier international sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains (Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens). L'anticorps est conjugué à la phycoérythrine R (PE). Le rapport molaire F/P est compris entre 1,0 et 2,0.

Les anticorps ont été purifiés à partir d'ascites ou d'un milieu de culture tissulaire par chromatographie sur colonne (chromatographie par échange d'ions et/ou chromatographie d'affinité).

Ingrédients du réactif

Les réactifs sont fournis dans 1 ml de tampon TRIS 20 mM et NaCl 150 mM pH 8,0, ou une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) contenant de l'ASB ou une autre protéine stabilisante et du NaN₃ (0,1 %, p/v) servant de conservateurs. (voir le tableau 1).

Tableau 1. Contenu des flacons

FITC	100 tests par ml dans du PBS
PE	100 tests par ml dans du TRIS

AVERTISSEMENT :

L'azide de sodium est nocif s'il est ingéré (R22). Conserver hors de portée des enfants (S2). Conserver à l'écart de tout aliment, boisson et aliment pour animaux (S13). Porter des vêtements de protection adaptés (S36). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer cette boîte ou la notice (S46). Le contact avec des acides libère un gaz très toxique (R32). Les composés d'azide doivent être éliminés avec de grandes quantités d'eau afin d'éviter des dépôts sur les conduites de plomb ou de cuivre, qui constituent des risques d'explosion.

CONSERVATION ET MANIPULATION

Le réactif à l'anticorps est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Ne pas congeler le réactif ni l'exposer à la lumière directe lors de son stockage ou de l'incubation avec des cellules. Conserver le flacon de réactif sec.

Ne pas utiliser les réactifs en cas de signe de détérioration : augmentation de compensation ou perte importante de réactivité.

3. REACTIFS OU MATERIEL

NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Solution de lyse (PeliLyse, numéro de commande M7101.6).
- Tampon de lavage et de dilution pour cellules mononucléées, solution saline tamponnée au phosphate contenant 0,2 % d'ASB (p/v) ; PBS/ASB.
- Tampon de lavage et de dilution pour plaquettes, Tampon Sequestrine (Seq), conservation 1 mois entre 2 et 8 °C. Solution mère 10 x, dissoudre dans un litre d'eau distillée :
Na₂HPO₄ · H₂O : 31,3 g
Na₂EDTA · 2H₂O : 33,3 g
NaCl : 90,0 g
- Avant utilisation, diluer dans de l'eau distillée, ajouter de l'ASB jusqu'à une concentration finale de 0,2 % (p/v). Mélanger et ajuster le pH à 6,8.
- Tampon de fixation, PFA/ASB (*) : Paraformaldéhyde 1 % dans PBS, contenant 0,2 % d'ASB (pH 7,2).
- Plaques à micropuits (96 puits, fond en V) ou tubes en plastique pour cytométrie de flux. Cytomètre de flux. Se référer au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus d'informations.

(*) La procédure utilise un fixatif, le formaldéhyde. Eviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

4. ECHANTILLON(S)

Les échantillons de sang peuvent être préparés pour l'analyse par cytométrie de flux en utilisant des procédures de préparation de CMSP. La préparation des CMSP donne des résultats qui dépendent plus de la technique (1).

Prélever le sang de manière aseptique par ponction veineuse (1,2) dans des tubes de recueil de sang stériles K₂EDTA. Au moins 1 ml de sang complet est nécessaire pour la méthode sur sang complet et au moins 2 ml de sang complet sont nécessaires pour la préparation des CMSP. Conserver le sang anticoagulé à température ambiante (18 à 25 °C).

AVERTISSEMENT :

Considérer tous les échantillons biologiques ainsi que le matériel qui entre en contact avec eux comme présentant un risque biologique. Les échantillons doivent être manipulés comme des échantillons potentiellement infectieux (3,4) et éliminés conformément aux réglementations fédérales, d'état et locales. Ne pas pipeter à la bouche. Porter des vêtements et des gants de protection adaptés. Il a été rapporté que la fixation désactive le VIH (5).

5. PROCEDURES

A: Méthode avec cellules purifiées ficoll

- 1 Préparer une suspension de cellules mononucléées à une concentration de 1 x 10⁶ cellules/ml.
- 2 Ajouter 40 µl de suspension de cellules dans des puits de microtitration ou des tubes.
- 3 Ajouter 10 µl de l'anticorps non dilué aux puits de microtitration ou aux tubes et mélanger doucement.
- 4 Incuber pendant 30 minutes entre 2 et 8 °C.
- 5 Ajouter 150 µl de tampon aux puits de microtitration ou 2 ml de tampon aux tubes et centrifuger à 500 x g pendant 5 minutes.
- 6 Aspirer le surnageant du pellet de cellules et remettre les cellules en suspension.
- 7 Ajouter 200 µl de tampon aux puits de microtitration ou 2 ml de tampon aux tubes et centrifuger à 500 x g pendant 5 minutes.
- 8 Aspirer le surnageant du pellet de cellules et remettre les cellules en suspension.
- 9 Analyse sur cytomètre de flux : Ajouter 200 µl de tampon aux puits de microtitration et transférer cette suspension finale de cellules dans des tubes à essai appropriés ou ajouter 200 µl de tampon dans les tubes.
- 10 Si l'analyse ne peut être pratiquée dans les huit heures qui suivent, ajouter 200 µl de PFA 1 % au lieu de tampon, au point 9. Sanquin Reagents recommande de pratiquer ensuite l'analyse dans les 24 heures.

B : Méthode sur sang total

- 1 Prélever le sang dans un tube de recueil de sang contenant de l'EDTA.
- 2 Verser 100 µl (*) de sang complet soigneusement mélangé au fond de chaque tube à essai.
- 3 Ajouter 10 µl des anticorps non dilués au fond du tube à essai et mélanger fermement pendant 30 secondes.
- 4 Incuber pendant 15 à 30 minutes à température ambiante.
- 5 Mélanger les tubes et ajouter 2 ml de solution de lyse (PeliLyse A1, diluée 10 x).
- 6 Incuber pendant 10 à 15 minutes à température ambiante jusqu'à ce que la lyse soit terminée.
- 7 Analyser les échantillons dans les 90 minutes qui suivent.

Si l'analyse ne peut être effectuée dans les 90 minutes, centrifuger les tubes à 500 x g pendant 5 minutes. Aspirer le surnageant du pellet de cellules et remettre les cellules en suspension dans 1 ml de tampon pour une analyse dans les 8 heures ou dans 1 ml de PFA à 1 %. Sanquin Reagents recommande de pratiquer ensuite l'analyse dans les 24 heures.

* Cette méthode a été mise au point pour les échantillons sanguins présentant une numération leucocytaire normale et en utilisant PeliLyse A1 (solution de lyse, numéro de référence M7101.6). Il peut être nécessaire d'ajuster la quantité de sang pour des échantillons présentant une numération leucocytaire très élevée ou très basse.

C : Cytométrie de flux et microscopie de la membrane plaquettaire.

1. Transférer 45 µl de suspension plaquettaire sur la plaque à micropuits ou dans des tubes puis ajouter 5 µl d'anticorps monoclonal*. Mélanger doucement puis incuber pendant 30 minutes entre 2 et 8 °C.
2. Rincer en mélangeant puis en ajoutant un tampon Sequestrine (Seq) à la plaque à micropuits (150 µl au premier lavage, 200 µl au second) ou aux tubes (2 ml). Centrifuger à 1000 x g pendant 5 minutes, aspirer le surnageant puis renouveler une fois cette procédure.
3. Préparer les cellules pour l'analyse : Pour la cytométrie de flux, remettre les cellules en suspension en ajoutant 200 µl de Seq à la plaque à micropuits ou aux tubes. En cas d'utilisation d'une plaque à micropuits, le contenu est transféré dans des tubes appropriés. Pour une microscopie à fluorescence, remettre les cellules en suspension dans 50 µl de produit d'inclusion, transférer les cellules sur une lame de microscope puis déposer une lame de protection.

* En règle générale, il est possible d'utiliser 5 µl d'anticorps monoclonal non dilué. Alternativement, il est possible de déterminer une dilution optimale. Il est nécessaire de toujours utiliser un contrôle négatif de même isotype pour déterminer la fluorescence d'arrière-plan.

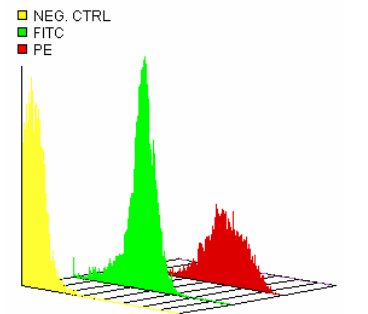
Résultats de l'analyse

Dans le cadre de certaines maladies, on peut s'attendre à observer des nombres anormaux de cellules exprimant cet antigène ou des niveaux d'expression aberrants de cet antigène. Il est important de comprendre le schéma d'expression normal de cet antigène et sa relation avec l'expression d'autres antigènes pertinents afin de réaliser une analyse adéquate.

Cytométrie de flux

Agiter les cellules soigneusement à faible vitesse pour limiter l'aggrégation avant de faire passer les cellules sur le cytomètre de flux (6). Acquérir et analyser les données en mode liste à l'aide d'un logiciel approprié. Avant l'acquisition des échantillons, ajuster le seuil pour minimiser les débris et assurer que les populations concernées sont incluses. La figure 1 présente des données représentatives obtenues sur des lymphocytes triés. Excitation du laser à 488 nm.

Fig. 1. Profil de fluorescence, canaux de dispersion réglés sur plaquettes activées(R1)



REMARQUE : Un réglage incorrect du canal sur les données d'échantillon peut donner des résultats incorrects.

Contrôle de qualité interne

L'utilisation d'un contrôle négatif (consulter le catalogue de Sanquin Reagents) est recommandée afin de déterminer la fluorescence d'arrière-plan produite en raison des capacités de liaison de Fc par les cellules mononucléées.

La concentration et le rapport F/P de ces contrôles ont été ajustés selon les anticorps monoclonaux de Sanquin Reagents.

6. PERFORMANCES

Spécificité

L'anticorps monoclonal est dirigé contre l'antigène CD62P (sélectine P, GMP-140 ou PADGEM) qui est exprimé sur les mégacaryocytes, les cellules endothéliales et dans les granules plaquettaires alpha et qui est transféré sur la surface des plaquettes après activation à l'aide de puissants agonistes (la masse moléculaire est de 140 kDa). Une protéine similaire, dérivée des corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, est exprimée de façon transitoire à la surface des cellules endothéliales activées. (7-10).

Sensibilité

La sensibilité est définie comme une distinction entre la population CD négative et la population CD positive différente. La sensibilité a été mesurée en évaluant plusieurs concentrations d'anticorps. Chaque concentration a été testée sur du sang complet. La séparation des populations CD positives des populations CD négatives a été déterminée à partir de chaque échantillon et une moyenne a été calculée pour chaque concentration. La concentration d'anticorps en flacon pour chaque réactif a fourni une sensibilité optimale pour la distinction entre les cellules CD positives et les cellules CD négatives.

Reproductibilité/Répétabilité.

Les CD ont été soumis à l'un des Ateliers internationaux sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains (International Workshops on Human Leukocyte Differentiation Antigens) ou remplissent les spécifications de l'atelier (voir composition).

Pour déterminer la répétabilité de la coloration avec chaque réactif, les échantillons ont été colorés avec plusieurs lots de réactifs. Les différents échantillons utilisés pour l'évaluation ont donné une valeur d'intensité de fluorescence moyenne présentée dans le tableau 2. Pour chaque échantillon, deux lots différents de réactifs ont généré une paire de résultats. Les écarts type individuels ont été déterminés à partir des résultats groupés en paire de chaque échantillon. Les écarts type ont été combinés pour dériver un écart type groupé pour chaque réactif qui fournit une estimation de la reproductibilité intra-échantillon.

Tableau 2. Répétabilité de l'intensité de fluorescence moyenne de cellules cibles dans des lots différents (N) et pour des donneurs multiples

	N.*	Intensité de fluorescence moyenne	Ecart type groupé	CV % groupé
FITC	1	74.72	0.40	0.54%
PE	4	317.6	69.5	21.9%

* N = nombre d'échantillons

7. LIMITES

Les conjugués avec des fluorochromes plus brillants (PE, PE-Cy5) donnent une séparation plus importante que les conjugués avec d'autres colorants (FITC). Lorsque les populations se chevauchent, le calcul du pourcentage positif pour les marqueurs peut être affecté par le choix du fluorochrome.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dans le cadre du traitement du patient peut interférer avec la reconnaissance d'antigènes cible par ce réactif. Cela doit être pris en compte lors de l'analyse d'échantillons de patients traités de cette manière. Sanquin Reagents n'a pas caractérisé l'effet de la présence d'anticorps thérapeutiques sur les performances de ce réactif.

Les réactifs uniques ne peuvent fournir que des informations limitées pour l'analyse des leucémies et des lymphomes. L'utilisation d'associations d'autres réactifs et l'application d'autres procédures diagnostiques peuvent fournir plus d'informations que l'utilisation de ces réactifs uniquement. L'analyse multicolore utilisant des associations adéquates de réactifs est fortement recommandée.

Comme les réactifs peuvent être utilisés dans différentes associations, les laboratoires doivent se familiariser avec les propriétés de chaque anticorps en association avec d'autres marqueurs dans des échantillons normaux et anormaux.

Les performances des réactifs ont été classiquement évaluées sur sang traité à l'EDTA. Les performances des réactifs peuvent être affectées par l'utilisation d'autres anticoagulants.

DEPANNAGE

Problème	Cause possible	Solution
Faible distinction entre les débris et les lymphocytes	Interaction avec d'autres cellules et avec les plaquettes	Préparer et colorer un autre échantillon.
	Mauvaise manipulation de la préparation de cellules	Vérifier la viabilité des cellules ; centrifuger les cellules à une vitesse plus faible.
	Réglage inadéquat de l'instrument	Respecter les procédures de réglage de l'instrument ; optimiser les réglages de l'instrument selon les besoins.
Coloration faible ou diminuant	Concentration de cellules trop forte lors de l'étape de coloration	Vérifier et ajuster la concentration de cellules ou le volume de l'échantillon ; colorer avec de l'échantillon frais
	Quantité insuffisante de réactif	Refaire la coloration en utilisant une quantité plus importante d'anticorps.
	Cellules non analysées dans les 8 heures suivant la coloration	Répéter la coloration avec de l'échantillon frais ; analyser rapidement.
	Préparation incorrecte du milieu (oubli du conservateur)	Utiliser du conservateur dans le milieu de coloration et lors des étapes de lavage.
Peu ou pas de cellules	Concentration de cellules trop faible	Remettre en suspension de l'échantillon frais à une concentration plus élevée ; refaire la coloration et l'analyse.
	Mauvais fonctionnement du cytomètre	Dépanner l'instrument.

2 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition; Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.

3 *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.

4 Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. MMWR. 1988;37;377-388.

5 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.

6 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.

7 Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.*, 175, 1147-50 (1992).

8 Skinner, M.P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164,73-76 (1989).

9 Skinner, M.P. et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 5371-74 (1991).

10 Modderman, P.W. et al., *Leucocyte Typing IV*, 1038 (1989).

BIBLIOGRAPHIE

1 *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.

PeliCluster CD62P

Reagenti monoclonali murini diretti contro antigeni umani per l'identificazione di cellule che esprimono l'antigene CD62P.

Modello	REF	Clone
FITC	M2187	AK6
PE	M1706	CLB-thromb/6, C2

X0033-498ita 1902091159



1. DESTINAZIONE D'USO

Gli anticorpi PeliCluster sono stati progettati per l'utilizzo nella diagnostica *in vitro*. Il reagente identifica e quantifica le cellule che esprimono l'antigene CD utilizzando, per l'analisi, un citometro a flusso.

Per prevenire l'interferenza con gli eritrociti nel corso dell'analisi, si consiglia di trattare il sangue intero con il reagente lisante (PeliLyse A1, codice M7101.6).

Il citometro a flusso deve essere in grado di rivelare la dispersione della luce e l'appropriata fluorescenza e deve essere dotato del programma adatto per l'acquisizione e l'analisi dei dati. Per le istruzioni fare riferimento al manuale d'uso dello strumento.

Applicazioni

Rivelazione di piastrine attivate. Imaging di trombi.
Indagine immunostitologica della funzione di cellule endoteliali.

2. COMPOSIZIONE

Il clone AK-6 appartiene alla sottoclasse IgG1 delle immunoglobuline murine. L'anticorpo è stato presentato come anti CD62P nel corso del Quinto Convegno Internazionale sugli antigeni di differenziazione dei leucociti umani. L'anticorpo è coniugato con l'isomero 1 della fluoresceina isotiocianato (FITC). Il rapporto molecolare F/P è compreso tra 5 e 10.

Il clone CLB-thromb/6, C2 deriva dall'ibridizzazione di cellule SP2/O Ag14 con splenociti di un topo (BALB/c x A/J) immunizzato con piastrine umane. Il clone appartiene alla sottoclasse IgG1 delle immunoglobuline murine. L'anticorpo è stato presentato come anti CD62P nel corso del Quinto Convegno Internazionale sugli antigeni di differenziazione dei leucociti umani. L'anticorpo è coniugato con la R-fluoresceina (PE). Il rapporto molecolare F/P è compreso tra 1 e 2.

Gli anticorpi sono stati purificati da asciti o da terreni di coltura utilizzando la tecnica cromatografica (cromatografia a scambio ionico e/o cromatografia di affinità).

Contenuto del reagente

I reagenti sono forniti in 1 ml di soluzione composta da TRIS 20 mM e NaCl 150 mM, pH 8,0 o di tampone fosfato isotonic (PBS), contenente BSA o un'altra proteina stabilizzante e Na₂ O,1% (p/v) come conservante (vedi tabella 1).

Tabella 1. Contenuto delle bottiglie

FITC	100 test per ml in PBS
PE	100 test per ml in TRIS

AVVERTENZE:

La sodiazide è dannosa in caso d'ingestione (R22). Conservare fuori della portata dei bambini (S2). Conservare lontano da alimenti, bevande e mangimi per animali (S13). Indossare indumenti protettivi idonei (S36). In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o la sua etichetta (S46). A contatto con acidi libera gas altamente tossici (R32). Durante l'eliminazione, i composti dell'azide devono essere lavati via con grandi volumi di acqua per evitare depositi nei tubi di piombo o di rame in cui possono verificarsi condizioni esplosive.

3. CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE

Se conservato a temperature comprese tra 2 e 8°C, l'anticorpo è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Non utilizzare oltre la data di scadenza. Non congelare il reagente o esporlo alla luce diretta del sole

durante la conservazione o l'incubazione con le cellule. Tenere asciutto l'esterno del flaconcino contenente il reagente.

Se si notano segni di deterioramento (ad es. un aumento di compensazione o una perdita sostanziale di reattività) non utilizzare il reagente.

4. REAGENTI O MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Soluzione lisante (PeliLyse, codice M7101.6).
- Tampone di lavaggio e di diluizione per cellule mononucleari, tampone fosfato isotonic, contenente 0,2% di BSA (peso/volume); PBS/BSA
- Tampone di lavaggio e di diluizione per piastrine, Tampone Sequestreine (Seq), conservazione 1 mese a temperatura compresa tra 2 e 8°C.
- Soluzione stock 10 x, dissolvere in 1 litro di acqua distillata:
Na₂HPO₄ · H₂O : 31,3 g
Na₂EDTA · 2H₂O : 33,3 g
NaCl : 90,0 g

Prima dell'uso diluire in acqua distillata, aggiungere BSA fino alla concentrazione finale di 0,2% (peso/volume). Miscelare e aggiustare il pH a 6,8.

- Tampone di fissaggio, PFA/BSA (*): Paraformaldeide 1% in PBS, contenente 0,2% di BSA (pH 7,2).
- Piastrine Elisa (a 96 pozzetti, fondo a V) o tubi di plastica per citometria a flusso. Citometro a flusso. Per maggiori informazioni fare riferimento al manuale d'uso dello strumento.

(*) La procedura prevede l'utilizzo di un fissante, la formaldeide. Evitare il contatto con la pelle o le membrane mucose.

5. CAMPIONE(I)

I campioni di sangue possono essere preparati per l'analisi citometrica utilizzando le procedure di preparazione PBMC. La preparazione PBMC da risultati più dipendenti dalla tecnica.

Raccogliere il sangue asetticamente, con puntura venosa (1,2), in provette sterili con K₂EDTA per la raccolta di sangue. Per il metodo del sangue intero è necessario almeno 1 ml di sangue; per la preparazione PBMC sono richiesti almeno 2 ml di sangue intero. Conservare il sangue non coagulato a temperatura ambiente (da 18 a 25°C).

AVVERTENZE:

Considerare tutti i campioni biologici ed i materiali che vengono a contatto con questi come materiale biologico pericoloso. I campioni devono essere maneggiati come potenzialmente infetti (3,4) ed eliminati secondo le disposizioni federali, statali e locali Non pipettare con la bocca. Indossare idonei indumenti protettivi e guanti. E' stato riportato che la fissazione inattiva il virus dell'HIV (5).

6. PROCEDURE

A: Metodo delle cellule purificate con ficoll

- 1 Preparare una sospensione cellulare mononucleare con una concentrazione pari a 1×10^7 cellule/ml.
- 2 Dispensare 40 μ l di sospensione cellulare nei pozzetti di una piastra ELISA o nelle provette.
- 3 Aggiungere 10 μ l di anticorpo non diluito ai pozzetti di una piastra ELISA o nelle provette e mescolare delicatamente.
- 4 Incubare per 30 minuti ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C.
- 5 Aggiungere 150 μ l di tampone ai pozzetti della piastra ELISA o 2 ml di tampone alle provette e centrifugare a 500 x g per 5 minuti.
- 6 Aspirare il supernatante dal pellet e risospendere le cellule.
- 7 Aggiungere 200 μ l di tampone ai pozzetti della piastra ELISA o 2 ml di tampone alle provette e centrifugare a 500 x g per 5 minuti.
- 8 Aspirare il supernatante dal pellet e risospendere le cellule.
- 9 Analisi con citometro a flusso: aggiungere 200 μ l di tampone ai pozzetti delle piastrine ELISA e trasferire la sospensione cellulare finale alle provette appropriate, oppure aggiungere 200 μ l di tampone direttamente alle provette.
- 10 Se non è possibile effettuare l'analisi nelle 8 ore successive aggiungere, al punto 9, 200 μ l di PFA 1% al posto del tampone. Sanquin Reagents consiglia di effettuare l'analisi entro 24 ore.

B: Metodo del sangue intero

- 1 Prelevare il sangue in una provetta contenente EDTA.

- 2 Dispensare 100 μ l (*) di sangue intero ben miscelato sul fondo di una provetta per l'analisi.
- 3 Aggiungere 10 μ l di anticorpi non diluiti sul fondo della provetta e miscelare fermamente per 30 secondi.
- 4 Incubare da 15 a 30 minuti a temperatura ambiente.
- 5 Miscelare le provette e aggiungere 2 ml di soluzione lisante (PeliLyse A1, 10x diluita).
- 6 Incubare da 10 a 15 minuti a temperatura ambiente fino alla lisi completa delle cellule.
- 7 Analizzare i campioni entro 90 minuti.

Se non è possibile effettuare l'analisi entro 90 minuti, centrifugare le provette a 500x g per 5 minuti. Se l'analisi è effettuata entro 8 ore, aspirare il supernatante dal pellet e risospendere le cellule in 1 ml di tampone. In caso contrario il pellet va risospeso in 1 ml di PFA 1%. Sanquin Reagents consiglia di effettuare l'analisi entro 24 ore.

* Questo metodo è stato sviluppato per campioni di sangue con un conteggio del bianco normale utilizzando PeliLyse A1 (soluzione lisante, codice M7101.6). Nel caso di campioni con un conteggio del bianco molto alto o molto basso può essere necessario aggiustare la quantità di sangue.

C: Citometria a flusso e microscopia della membrana delle piastrine.

- 1 Trasferire 45 μ l di una sospensione di piastrine nella piastra Elisa o in provette ed aggiungere 5 μ l di anticorpo monoclonale*. Miscelare delicatamente ed incubare per 30 minuti ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C.
- 2 Lavare miscelando ed aggiungere Seq alla piastra Elisa (1° lavaggio 150 μ l, 2° lavaggio 200 μ l) o alle provette (2 ml). Centrifugare a 1000 x g per 5 minuti ed aspirare il supernatante, ripetere la procedura una seconda volta.
- 3 Preparazione delle cellule per l'analisi: Per la citometria a flusso, risospendere le cellule aggiungendo alla piastra Elisa o alle provette 200 μ l di Seq. Se si è utilizzata una piastra Elisa, trasferire il contenuto dei pozzetti in idonee provette. Per la microscopia in fluorescenza, risospendere le cellule in 50 μ l di terreno di fissaggio, trasferire le cellule su un vetrino da microscopia e coprirle con un coprioggetto.

* In generale, si consiglia di utilizzare 5 μ l di anticorpo monoclonale non diluito. In alternativa, è possibile determinare una diluizione ottimale. Per determinare la fluorescenza di base utilizzare sempre un controllo negativo dallo stesso isotopo.

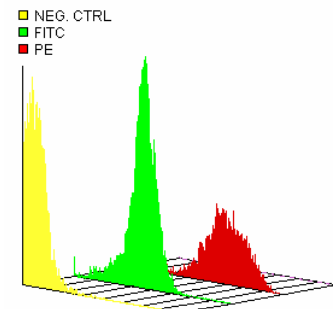
Risultati analitici

In alcuni stati patologici ci si può attendere un numero elevato di cellule esprimenti tale antigene o livelli di espressione dell'antigene anormale. Per effettuare l'analisi appropriata è importante comprendere il normale pattern di espressione di tale antigene e la sua relazione con l'espressione di altri antigeni rilevanti.

Citometria a flusso.

Prima di correre le cellule sul citometro a flusso, miscelarle accuratamente, utilizzando un vortex a bassa velocità, per ridurre l'aggregazione (6). Acquisire e analizzare i dati in modalità elenco utilizzando il programma adatto. Prima di acquisire i campioni, aggiustare la soglia per minimizzare i detriti ed assicurarsi che le popolazioni di interesse siano incluse. La fig. 1 mostra alcuni dati rappresentativi derivanti da linfociti gated. L'eccitazione laser è a 488 nm.

Fig. 1: Profilo di fluorescenza, gates di dispersione impostati sulla piastrine attivati (R1).



NOTA: Una impostazione impropria del gate sui dati dei campioni può fornire risultati non corretti.

Controllo di qualità interno

Si consiglia l'uso di un controllo negativo (consultare il catalogo dei reagenti Sanquin) per determinare la fluorescenza di base prodotta dalla capacità di legame delle cellule mononucleari tramite il frammento Fc. La concentrazione ed il rapporto F/P di questi controlli sono stati aggiustati rispetto agli anticorpi monoclonali coniugati Sanquin Reagents.

7. CARATTERISTICHE DI FUNZIONAMENTO

Specificità

L'anticorpo monoclonale è diretto contro l'antigene CD62P (selectina P, GMP-140 o PADGEM). Questo è espresso su megacariociti, sulle cellule endoteliali e nei granuli alfa delle piastrine e trasloca sulla superficie dei trombociti in seguito ad attivazione da parte di agonisti forti (peso molecolare 140 kDa). Una proteina simile, derivata dai corpuscoli di Weibel-Palade delle cellule endoteliali, è espressa in modo transiente sulla superficie di cellule endoteliali attivate. (7-10).

Sensibilità

La sensibilità è definita dalla separazione della popolazione CD negativa dalla diversa popolazione CD positiva. La sensibilità è stata misurata valutando un intervallo di concentrazioni dell'anticorpo. Ogni concentrazione è stata analizzata sul sangue intero. Per ogni campione è stata determinata la separazione delle cellule CD positive da quelle CD negative ed è stata calcolata la media per ogni concentrazione. La concentrazione dell'anticorpo nella bottiglia per ogni reagente garantisce una sensibilità ottimale per la separazione delle cellule CD positive da quelle CD negative.

Riproducibilità/Ripetibilità

I CD sono presentati nel corso di uno dei Convegni Internazionali sugli antigeni di differenziazione dei leucociti umani o soddisfano le indicazioni del Convegno (vedi composizione).

Per determinare la ripetibilità della colorazione con tutti i reagenti, i campioni sono stati colorati con diversi lotti di reagenti. I diversi campioni utilizzati nella valutazione hanno fornito un valore medio di intensità di fluorescenza (MFI) come riportato nella tabella 2. Per ogni campione, due diversi lotti di reagenti hanno generato una coppia di risultati. In base alle coppie di risultati, sono stati determinati SDs individuali per ogni campione. Per ogni reagente, gli SDs sono stati raggruppati per dare origine ad un SD congiunto in grado di fornire una stima della ripetibilità all'interno del campione.

Tabella 2. Ripetibilità dell'intensità di fluorescenza media (MFI) di cellule bersaglio con diversi lotti (N) e molteplici donatori.

	N *	MFI media	SD congiunto	%CV congiunto
FITC	1	74.72	0.40	0.54%
PE	4	317.6	69.5	21.9%

* N = numero di campioni

8. LIMITAZIONI

Coniugati con fitocromi più luminosi (PE, PE-Cy5) forniranno una maggiore separazione rispetto a coniugati con altri coloranti (FITC). Quando le popolazioni si sovrappongono, il calcolo della percentuale positiva per un determinato marker può essere influenzato dalla scelta del fluorocromo.

L'uso di anticorpi monoclonali nel trattamento di pazienti può interferire con il riconoscimento degli antigeni bersaglio da parte di questo reagente. Di questo bisogna tenere conto quando si analizzano campioni prelevati da pazienti trattati in questo modo. Sanquin Reagents non ha caratterizzato l'effetto della presenza di anticorpi terapeutici sul funzionamento di questo reagente. I singoli reagenti possono fornire solo un'informazione limitata nell'analisi delle leucemie e dei linfomi. Utilizzando combinazioni di altri reagenti e applicando altre procedure diagnostiche si possono ottenere maggiori informazioni rispetto a quelle ottenibili impiegando unicamente questi reagenti. Si raccomanda vivamente un'analisi a più colori utilizzando adeguate combinazioni di reagenti.

Tenendo presente che i reagenti possono essere utilizzati in combinazioni diverse, è necessario che i laboratori familiarizzino con le proprietà di ogni anticorpo in associazione con altri marcatori, in campioni normali e non.

I dati sull'attività del reagente sono stati raccolti solitamente a partire da sangue trattato

con EDTA. L'attività del reagente può essere influenzata dall'uso di altri anticoagulanti.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Problema	Possibile causa	Soluzione
Scarsa risoluzione tra detriti e linfociti	Interazione con altre cellule e con piastrine Manipolazione e grossolana della preparazione cellulare Impostazione dello strumento non adatta.	Preparare e colorare un altro campione. Verificare la vitalità cellulare, centrifugare le cellule a velocità inferiori. Seguire le procedure di impostazione dello strumento idonee; ottimizzare, in base alle necessità, le impostazioni dello strumento.
Colorazione buia o affievolita	Concentrazione cellulare troppo alta al momento della colorazione Reagente insufficiente Cellule non analizzate entro 8 ore dalla colorazione Preparazione del medium non adatta (senza conservante)	Verificare ed aggiustare la concentrazione cellulare o il volume del campione; colorare con campione fresco. Ripetere la colorazione con una maggiore quantità di anticorpo. Ripetere la colorazione con campione fresco; analizzare immediatamente. Utilizzare il conservante nel terreno di colorazione e durante i lavaggi.
Poche cellule o assenza di cellule	Concentrazione cellulare troppo bassa Cattivo funzionamento del citometro	Risospendere il campione fresco ad una concentrazione maggiore; ripetere la colorazione e l'analisi. Consultare la sezione Risoluzione problemi dello strumento.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1 *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.

2 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition;Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.

3 *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.

4 Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. MMWR. 1988;37:377-388.

5 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.

6 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC; American Society for Microbiology; 1986:226-235.

7 Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.*, 175, 1147-50 (1992).

8 Skinner, M.P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164,73-76 (1989).

9 Skinner, M.P. et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 5371-74 (1991).

10 Modderman, P.W. et al., *Leucocyte Typing IV*, 1038 (1989).

PeliCluster CD62P

Reactivos monoclonales de ratón antihumanos para la identificación de células que expresan el antígeno CD62P.

Forma	REF	Clon
ITCF	M2187	AK6
PE	M1706	CLB-thromb/6, 4E1

X0033-498spa 1902091159



1. USO PREVISTO

Los anticuerpos PeliCluster son para uso diagnóstico *in vitro*. Los reactivos identifican y enumeran las células que expresan el antígeno CD, utilizando un citómetro de flujo para el análisis.

Para evitar interferencias con los hematíes durante el análisis, se recomienda el tratamiento de la sangre completa con un reactivo de lisis (PeliLyse A1, número de pedido M7101.6).

El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar la dispersión de la luz y la fluorescencia apropiada, y debe estar equipado con el software apropiado para la adquisición y el análisis de datos. Consulte las instrucciones en el manual de uso del instrumento.

Aplicaciones

Detección de plaquetas activadas. Adquisición de imágenes de trombos. Investigación inmunohistológica del funcionamiento de las células endoteliales.

2. COMPOSICIÓN

El clon AK-6 pertenece a la subclase IgG1 de ratón. El anticuerpo fue clasificado como CD62P en el Quinto Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos. El anticuerpo está conjugado con isómero 1 de isotiocianato de fluoresceína (ITCF). La proporción de moléculas F/P oscila entre 5 y 10.

El clon CLB-thromb/6, C2 se obtuvo por hibridación de células SP2/O Ag14 con células de bazo de un ratón (BALB/c x A/J) inmunizado con plaquetas humanas. Este clon pertenece a la subclase IgG1 de ratón. El anticuerpo fue clasificado como CD62P en el Quinto Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos. El anticuerpo está conjugado con R-ficoeritrina (FE). La proporción de moléculas F/P oscila entre 1,0 y 2,0.

Los anticuerpos se purificaron del líquido ascítico o del medio de cultivo de tejidos por cromatografía en columna (cromatografía de intercambio iónico o de afinidad).

Contenido de los reactivos.

Los reactivos se suministran en 1 ml de TRIS 20 mM con NaCl 150 mM, pH 8,0, o solución salina tamponada con fosfatos (PBS), y contienen albúmina sérica de bovino (BSA) u otra proteína estabilizante, y NaN₃ al 0,1% (p/v) como conservante (véase la tabla 1).

Tabla 1. Contenido de los frascos

ITCF	100 ensayos/ml en PBS
PE	100 ensayos/ml en TRIS

ADVERTENCIA:

La azida sódica es nociva si se ingiere (R22). Mantener fuera del alcance de los niños (S2). Mantener lejos de alimentos, bebidas y piensos para animales (S13). Llevar ropa protectora adecuada (S36). En caso de ingestión, consultar inmediatamente un médico y mostrar este envase o la etiqueta (S46). El contacto con ácidos libera un gas muy tóxico (R32). Los compuestos de azida deben desecharse seguidos de grandes cantidades de agua para evitar su acumulación en las tuberías de plomo o cobre, donde pueden desarrollarse condiciones explosivas.

3. CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN

El anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta, siempre que se conserve a una temperatura de 2 a 8

°C. No utilizar después de la fecha de caducidad. No congelar el reactivo ni exponerlo a la luz directa durante su conservación o incubación con células. Mantener seca la parte exterior del vial del reactivo. No utilizar el reactivo si muestra señales de deterioro, tales como aumento de compensación, o si se observa una pérdida significativa de reactividad.

4. REACTIVOS O MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Solución de lisis (PeliLyse, número de pedido M7101.6).
- Tampón de lavado y dilución para células mononucleares, solución salina tamponada con fosfatos (PBS), con 0,2% de BSA (p/v) (PBS/BSA).
- Tampón de lavado y dilución para plaquetas, Tampón de sequestrene (Seq), conservación 1 mes a 2-8 °C. Solución concentrada 10 x, disolver en 1 litro de agua destilada:

Na₂HPO₄ · H₂O

:

31,3 g

Na₂EDTA · 2H₂O

:

33,3 g

NaCl

:

90,0 g

Antes de utilizar la dilución en agua destilada, añadir BSA hasta alcanzar una concentración final de 0,2% (p/v). Mezclar y ajustar el pH a 6,8.
- Tampón de fijación, PFA/BSA (*): Paraformaldehído al 1% en PBS, con 0,2% de BSA (pH 7,2).
- Microplacas (96 pocillos, fondo V) o tubos de plástico para citometría de flujo.
- Citómetro de flujo. Consulte las instrucciones en el manual de uso del instrumento.

(* El procedimiento emplea una sustancia fijadora, formaldehído. Evitar el contacto con la piel o las membranas mucosas.

5. MUESTRAS

Las muestras de sangre se pueden preparar para el análisis citométrico de flujo utilizando los procedimientos de preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La preparación de PBMC ofrece resultados más dependientes de la técnica (1).

Recoger sangre de forma aséptica por venipunción (1,2) en un tubo de muestras estéril con K₂EDTA. Para el método de sangre completa se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa y para la preparación de PBMC, un mínimo de 2 ml de sangre completa. Conservar la sangre anticoagulada a temperatura ambiente (18-25°C).

ADVERTENCIA:

Todas las muestras biológicas y los materiales en contacto con ellas deben considerarse como material con riesgo biológico. Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas (3,4) y desecharse de acuerdo con las normativas federales, estatales y locales. No pipetear con la boca. Llevar ropa y guantes de protección adecuados. Se ha descrito que la fijación inactiva al VIH (5).

6. PROCEDIMIENTOS

- A: Método con células purificadas en Ficoll**
 - Preparar una suspensión de células mononucleares con una concentración de 1 x 10⁷ células/ml.
 - Añadir 40 µl de suspensión celular a los pocillos o tubos de microtitulación.
 - Añadir 10 µl de anticuerpos no diluidos a los pocillos o tubos de microtitulación, y mezclar con cuidado.
 - Incubar durante 30 minutos a 2-8°C.
 - Añadir 150 µl de tampón a los pocillos o 2 ml a los tubos, y centrifugar a 500 x g durante 5 minutos.
 - Aspirar el sobrenadante de la pastilla de células y resuspender las células.
 - Añadir 200 µl de tampón a los pocillos o 2 ml a los tubos, y centrifugar a 500 x g durante 5 minutos.
 - Aspirar el sobrenadante de la pastilla de células y resuspender las células.
 - Análisis de citometría de flujo:

Añadir 200 µl de tampón a los pocillos de microtitulación y transferir la suspensión final de células a tubos de ensayo apropiados, o añadir 200 µl de tampón a los tubos.
 - Si no es posible realizar el análisis en un plazo de 8 horas, añadir en el paso 9 200 µl de PFA al 1% en lugar de tampón. En este caso, Sanquin Reagents recomienda realizar el análisis en un plazo de 24 horas.

B: Método de sangre completa

- Recoger la sangre en un tubo de muestras que contenga EDTA.
- Transferir 100 µl (*) de sangre completa bien mezclada al fondo del tubo de ensayo.

- Añadir 10 µl de anticuerpos sin diluir al fondo del tubo de ensayo y agitar bien durante 30 segundos.
- Incubar durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente.
- Agitar los tubos y añadir 2 ml de solución de lisis (PeliLyse A1, 10x diluida).
- Incubar durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente hasta que la lisis esté completa.
- Analizar las muestras en un plazo de 90 minutos.

Si no es posible realizar el análisis en los siguientes 90 minutos, centrifugar los tubos a 500x g durante 5 minutos. Aspirar el sobrenadante de la pastilla de células y resuspender las células en 1 ml de tampón, si se van a analizar en un plazo de 8 horas, o en 1 ml de PFA al 1%. En este caso, Sanquin Reagents recomienda realizar el análisis en un plazo de 24 horas.

* Este método se desarrolló para muestras de sangre con un recuento de leucocitos normal con el uso de PeliLyse A1 (solución de lisis, número de pedido M7101.6). Puede ser necesario ajustar la cantidad de sangre en muestras con recuentos muy altos o bajos de leucocitos.

C: Citometría de flujo y microscopía con membranas de plaquetas

- Transferir 45 µl de suspensión de plaquetas a la microplaca o los tubos, y añadir 5 µl de anticuerpo monoclonal *. Mezclar suavemente e incubar durante 30 minutos a 2-8°C.
- Lavar mezclando y añadiendo Seq a la microplaca (1er lavado, 150 µl, 2º lavado, 200 µl) o a los tubos (2 ml). Centrifugar a 1000 x g durante 5 minutos y aspirar el sobrenadante; repetir este procedimiento una vez más.
- Preparar las células para el análisis: Para citometría de flujo, resuspender las células añadiendo 200 µl de Seq a la microplaca o a los tubos. Si se utilizó una microplaca, transferir el contenido a tubos apropiados. Para microscopía con fluorescencia, resuspender las células en 50 µl de medio de inclusión, transferirlas a un portaobjetos y colocar un cubreobjetos.

* En general, se pueden utilizar 5 µl de anticuerpo monoclonal sin diluir. O bien, se puede determinar una dilución óptima. Para determinar la fluorescencia de fondo se debe utilizar siempre un control negativo del mismo isotipo.

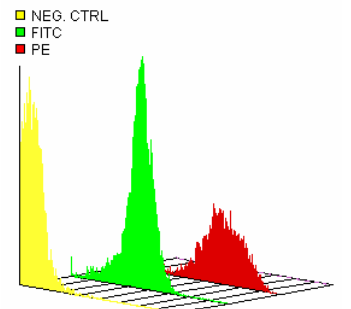
Resultados del análisis

En determinados estados patológicos pueden esperarse niveles anormales de células que expresen este antígeno o niveles aberrantes de expresión del antígeno. Es importante conocer el patrón normal de expresión de este antígeno y su relación con la expresión de otros antígenos relevantes para poder efectuar un análisis adecuado.

Citometría de flujo

Agitar exhaustivamente las células en un Vortex a velocidad baja para reducir la agregación antes de analizarlas por citometría de flujo (6). Adquirir y analizar los datos en modalidad de lista, utilizando el software apropiado. Antes de adquirir las muestras, ajustar el umbral para minimizar los residuos y asegurarse de que se incluyen las poblaciones de interés. La figura 1 muestra los datos representativos obtenidos con los linfocitos seleccionados. Excitación con láser a 488 nm.

Fig. 1: Perfil de fluorescencia, parámetros de dispersión en plaquetas activadas (FL)



OBSERVACIÓN: la configuración equivocada de los parámetros para los datos de la muestra puede dar lugar a resultados incorrectos.

Control de calidad interno

Se recomienda utilizar un control negativo (véase el catálogo de Sanquin Reagents) para determinar la fluorescencia de fondo producida

por las capacidades de unión a Fc de las células mononucleares. La concentración y proporción F/P de estos controles se han ajustado a los anticuerpos monoclonales conjugados de Sanquin Reagents.

7. EFICACIA DIAGNÓSTICA

Especificidad

El anticuerpo monoclonal está dirigido contra el antígeno CD62P (P-selectina, GMP-140 o PADGEM), que se expresa en los megacariocitos, las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas, y se transloca a la superficie de las plaquetas tras la activación con agonistas potentes (peso molecular 140 kDa). Una proteína similar, derivada de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, se expresa de forma transitoria en la superficie de las células endoteliales activadas. (7-10).

Sensibilidad

La sensibilidad se define como la discriminación entre la población negativa para CD y la población positiva para CD. La sensibilidad se determinó analizando una serie de concentraciones de anticuerpos. Cada concentración se analizó con sangre completa. En cada muestra se determinó la separación de positivos y negativos para CD, y se calculó la media para cada concentración. La concentración de anticuerpo envasado para cada reactivo proporcionó una sensibilidad óptima para discriminar entre las células positivas y negativas para CD.

Reproducibilidad/Repetibilidad

La clasificación como CD se realizó en uno de los Talleres Internacionales sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos o cumple con las especificaciones del Taller (véase la composición).

Para determinar la repetibilidad de la tinción con cada reactivo, las muestras se tiñeron con varios lotes de reactivos. Las diferentes muestras utilizadas en la evaluación mostraron una intensidad de fluorescencia media (MFI) tal como se muestra en la tabla 2. Para cada muestra, dos lotes distintos de reactivo generaron un par de resultados. Se determinaron las desviaciones estándar (DE) individuales a partir de los resultados pareados de cada muestra. Las DE se combinaron para obtener una DE conjunta para cada reactivo, que proporcione una estimación de la repetibilidad intramuestra.

Tabla 2. Repetibilidad de la intensidad de la fluorescencia media (IFM) de las células diana de diferentes lotes (N) y varios donantes.

	N *	Valor promedio MFI	Mezcla SD	Mezcla %CV
FITC	1	74.72	0.40	0.54%
PE	4	317.6	69.5	21.9%

* N = número de muestras

8. LIMITACIONES

Los conjugados con fluorocromos más brillantes (PE, PE-Cy5) muestran una mayor separación que aquellos con otros colorantes (ITCF). Cuando las poblaciones se superponen, el cálculo del porcentaje de positivos para los marcadores puede verse afectado por la elección del fluorocromo.

El tratamiento de los pacientes con anticuerpos monoclonales puede interferir con el reconocimiento de los antígenos diana por este reactivo. Esto debe tenerse en cuenta a la hora de analizar muestras de pacientes que han recibido un tratamiento de este tipo. Sanquin Reagents no ha caracterizado el efecto de la presencia de anticuerpos terapéuticos en la eficacia de este reactivo. Los reactivos individuales sólo proporcionan información limitada en el análisis de leucemia y linfomas. Una combinación de otros reactivos y la aplicación de otros procedimientos diagnósticos puede proporcionar más información que el uso de estos reactivos solos. Se recomienda el análisis multicolor con una combinación de reactivos apropiada.

Dado que los reactivos se pueden utilizar en diferentes combinaciones, los laboratorios deben familiarizarse con las propiedades de cada anticuerpo en combinación con otros marcadores en muestras normales y anormales.

Los datos de eficacia del reactivo se obtuvieron habitualmente con sangre tratada con EDTA. La eficacia del reactivo puede verse afectada por el uso de otros anticoagulantes.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa posible	Solución
Discriminación escasa entre residuos y linfocitos	Interacción celular con otras células y plaquetas	Preparar y teñir otra muestra.
	Manejo rudo de la preparación celular	Comprobar la viabilidad de las células; centrifugar las células a una velocidad más baja.
	Ajustes incorrectos del instrumento	Seguir los procedimientos correctos de ajuste del instrumento; optimizar los ajustes según sea necesario.
Tinción débil o que desaparece paulatinamente	Concentración de células demasiado alta en la fase de tinción	Controlar y ajustar la concentración de células o el volumen de la muestra; teñir una muestra fresca.
	Reactivo insuficiente	Repetir la tinción con una mayor cantidad de anticuerpo.
	Las células no se analizaron en un plazo de 8 horas después de la tinción	Repetir la tinción con una muestra nueva y analizarla en el plazo estipulado.
	Preparación incorrecta del medio (omisión del conservante)	Utilizar conservante en el medio de tinción y en el paso de lavado.
Pocas células o ausencia de células	Concentración celular demasiado baja	Resuspender una muestra nueva a una concentración mayor; repetir la tinción y el análisis.
	Mal funcionamiento del citómetro	Solucionar el problema del instrumento

10 Modderman, P.W. et al., *Leucocyte Typing IV*, 1038 (1989).

BIBLIOGRAFÍA

1 *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.

2 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition;Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.

3 *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.

4 Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.

5 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.

6 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC; American Society for Microbiology; 1986:226-235.

7 Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.*, 175, 1147-50 (1992).

8 Skinner, M.P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164,73-76 (1989).

9 Skinner, M.P. et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 5371-74 (1991).

PeliCluster CD62P

Reagentes monoclonais, anti-humanos, de ratinho, para a identificação de células que expressam os antígenos CD62P.

Forma	REF	Clone
FITC	M2187	AK6
PE	M1706	CLB-thromb/6, C2

X0033-498por 1902091159



1. FINALIDADE DA UTILIZAÇÃO
Os anticorpos PeliCluster destinam-se ao diagnóstico *in vitro*. Os reagentes identificam e enumeram as células que expressam o antígeno CD, utilizando um citómetro de fluxo para análise.
A fim de evitar a interferência com os eritrócitos durante o tratamento de análise de sangue total, recomenda-se o reagente de lise (PeliLyse A1, número de encomenda M7101.6).
O citómetro de fluxo deve estar equipado de forma a detectar dispersão ligeira e fluorescência apropriada, e possuir software apropriado para a recolha de dados e análise. As instruções constam do folheto informativo que acompanha o instrumento.

Aplicações
Detecção de plaquetas activadas. Visualização do trombo.
Investigação imunohistológica da função celular endotelial.

2. COMPOSIÇÃO
O clone AK-6 é duma subclasse de IgG1 de ratinho. O anticorpo foi submetido ao CD62P no Quinto Workshop Internacional de Antígenos de Diferenciação de Leucócitos Humanos. O anticorpo é conjugado com isómero 1 de iso-tiocianato de fluoresceína (ITCF). O índice molecular F/P situa-se entre 5 e 10.

O clone CLB-thromb/6, C2 derivou da hibridação de células SP2/O Ag14 com células de baço de um ratinho (BALB/c x A/J) imunizado com plaquetas humanas. Este clone é duma subclasse de IgG1 de ratinho. O anticorpo foi submetido ao CD62P no Quinto Workshop Internacional de Antígenos de Diferenciação de Leucócitos Humanos. O anticorpo está conjugado com R-ficoeritrina (FE). O índice molecular F/P situa-se entre 1,0 – 2,0.

Os anticorpos foram purificados a partir de líquido de ascite, ou de meio de cultura de tecido, utilizando cromatografia de coluna (troca de iões e/ou cromatografia por afinidade).

Teor dos reagentes
Os reagentes são fornecidos em 1 ml de 20 mM TRIS mais 150 mM de ClNa, pH 8,0, ou de fosfato salino tamponado (FST), contendo ASB ou outra proteína estabilizadora e NaNs 0,1% (w/v) como conservante. (ver Quadro 1).

Quadro 1. Teor dos frascos	
FITC	100 testes por ml em FST
PE	100 testes por ml em TRIS

PRECAUÇÕES:
O azido sódico é nocivo se for deglutido (R22). Mantenha fora do alcance das crianças (S2). Mantenha afastado de alimentos, de bebidas e de ração para animais (S13). Use vestuário protector adequado (S36). Se for ingerido, recorra de imediato a ajuda médica e mostre esta embalagem ou rótulo (S46). O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico (R32). Os compostos azídicos devem ser enxaguados com grandes volumes de água, aquando da sua eliminação, a fim de evitar depósitos nas tubagens de chumbo ou cobre, o que pode dar azo a explosões.

3. ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO
O reagente anticorpo é estável até à expiração do prazo de validade constante do rótulo,

quando armazenado entre 2 a 8°C. Não utilize depois de expirado o prazo de validade. Não congele o reagente, nem o exponha à luz directa durante a armazenagem ou incubação com células. Mantenha seco o exterior do frasco do reagente.
Os reagentes não devem ser utilizados caso haja qualquer evidência de deterioração, tal como um aumento na compensação, ou perda substancial de reactividade.

4. REAGENTES OU MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS
- Solução de lise (PeliLyse, número de encomenda M7101.6).
- Tampão lavagem e diluição para células mononucleares, fosfato salino tamponado, contendo 0,2% BSA (w/v); PBS/BSA.
- Tampão lavagem e diluição para plaquetas, Tampão sequestrina (Seq), 1 mês de armazenagem entre 2 e 8° C. 10 x solução de stock, a dissolver em 1 litro de água destilada:
Na2HPO4. H2O : 31,3 g
Na2EDTA.2H2O : 33,3 g
NaCl : 90,0 g
Diluir em água destilada antes de utilizar, juntar BSA até à concentração final de 0,2% (w/v). Misturar e ajustar o pH a 6,8.
- Tampão de fixação, PFA/BSA (*): Paraformaldeído 1% em PBS, contendo 0,2% BSA (pH 7,2).
- Microplacas (96 poços, fundo em V) ou tubos em plástico para citometria de fluxo.
- Citómetro de fluxo. O utilizador deve consultar a informação constante do guia informativo do respectivo instrumento.

(* O processo emprega um fixador, formaldeído. Deve-se evitar o contacto com a pele ou com as mucosas.

5. ESPÉCIMEN(S)
Podem-se preparar as amostras de sangue para a análise de fluxo citométrico utilizando processos de preparação PBMC. A preparação PBMC fornece mais resultados dependentes de técnica (1).

Proceder à colheita de sangue, de forma asséptica, por venopunctura (1,2), para um tubo de colheita de sangue, esterilizado, com K2EDTA. É necessário um mínimo de 1 ml de sangue total para o método de sangue total, e um mínimo de 2 ml de sangue total para a preparação PBMC. Armazenar à temperatura ambiente (18 a 25°C) o sangue anticoagulado.

PRECAUÇÕES:
Considerar todas as amostras biológicas e materiais que entrem em contacto com elas como sendo de perigo biológico. As amostras devem ser manipuladas como potencialmente infecciosas (3,4) e eliminadas de acordo com os regulamentos federais, estaduais e locais. Não pipetar com a boca. Usar roupas protectoras adequadas e luvas. Foi relatado que a fixação inactiva o VIH (5).

6. PROCEDIMENTOS
A: Método com células purificadas *ficoll*
1 Preparar uma suspensão celular mononuclear com uma concentração de 1 x 10⁷ células/ml.
2 Adicionar 40 µl de suspensão celular aos recipientes de microtitulação ou aos tubos.
3 Adicionar 10 µl de anticorpo não diluído aos recipientes de microtitulação ou aos tubos e misturar com cuidado.
4 Incubar durante 30 minutos entre 2 e 8 °C.
5 Adicionar 150 µl de tampão aos recipientes de microtitulação ou 2 ml de tampão aos tubos e centrifugar a 500 x g durante 5 minutos.
6 Aspirar o sobrenadante do *pellet* celular e resuspende as células.
7 Adicionar 200 µl de tampão aos recipientes de microtitulação ou 2 ml de tampão aos tubos e centrifugar a 500 x g durante 5 minutos.
8 Aspirar o sobrenadante do *pellet* celular e resuspende as células.
9 Análise do citómetro de fluxo:
Adicionar 200 µl de tampão aos recipientes de microtitulação e transferir esta suspensão celular final para os tubos apropriados, ou adicionar 200 µl de tampão aos tubos.
10 Se não for possível efectuar a análise dentro de 8 horas, adicionar no n° 9 200 µl PFA 1% em vez de tampão. A Sanquin Reagents recomenda que se proceda então à análise nas 24 horas seguintes.

B: Método de sangue total
1 Colher sangue para um tubo de colheita de sangue contendo EDTA.
2 Verter para o fundo do tubo de ensaio 100 µl (*) de sangue total bem misturado.

3 Adicionar no fundo do tubo de ensaio 10 µl dos anticorpos não diluídos, e misturar com firmeza durante 30 segundos.
4 Incubar durante 15 a 30 minutos à temperatura ambiente.
5 Misturar os tubos e adicionar 2 ml de solução de lise (PeliLyse A1, diluída 10x).
6 Incubar durante 10 a 15 minutos à temperatura ambiente, até a lise estar completa.
7 Analisar as amostras nos 90 minutos seguintes.

Se não for possível proceder à análise nos 90 minutos seguintes, centrifugar os tubos a 500 x g durante 5 minutos. Aspirar o sobrenadante do *pellet* celular e resuspende as células em 1 ml de tampão, caso a análise ocorra nas 8 horas seguintes, ou em 1 ml PFA 1%. A Sanquin Reagents recomenda que se proceda então à análise nas 24 horas seguintes.

* Este método foi concebido para amostras de sangue com uma contagem normal de leucócitos, utilizando o PeliLyse A1 (solução de lise, número de encomenda M7101.6). Poderá ser necessário ajustar a quantidade de sangue para amostras com uma contagem muito elevada, ou muito baixa, de leucócitos.

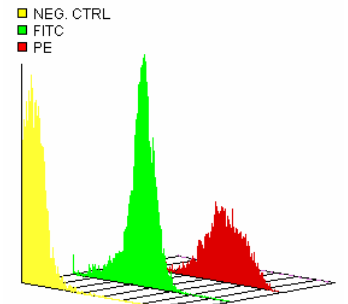
C: Microscopia e citometria de fluxo da membrana plaquetária.
1. Transferir 45 µl de suspensão plaquetária para a microplaca ou para tubos e adicionar 5 µl de anticorpo monoclonal*. Misturar com cuidado e incubar durante 30 minutos entre 2 e 8 °C.
2. Lavar, misturando e adicionando Seq à microplaca (1ª lavagem: 150 µl, 2ª lavagem: 200 µl) ou aos tubos (2 ml). Centrifugar a 1000 x g durante 5 minutos e aspirar o sobrenadante; repetir este processo mais uma vez.
3. Preparar as células para análise:
Para a citometria de fluxo, resuspende as células, adicionando 200 µl Seq à microplaca ou aos tubos. Se tiver sido utilizada uma microplaca, transferir os conteúdos para os tubos apropriados.
Para a microscopia de fluorescência, resuspende as células em 50 µl de meio de inclusão, transferir as células para uma lâmina de microscópio e cobrir com um vidro.

* Podem ser utilizados, duma forma geral, 5 µl de anticorpo monoclonal não diluído. Em alternativa, pode-se determinar uma diluição óptima. Para determinar a fluorescência de fundo, utilizar sempre um controlo negativo para o mesmo isótipo.

Resultados analíticos
Pode-se esperar encontrar nalguns estádios de doença números anormais de células expressando este antígeno, ou níveis de expressão aberrante do antígeno. É importante compreender o padrão de expressão normal para este antígeno, e a sua relação para a expressão de outros antígenos relevantes, de forma a efectuar uma análise adequada.

Citometria de fluxo
Agitar as células energicamente, a baixa velocidade, a fim de reduzir a agregação antes de correr as células no citómetro de fluxo (6). Recolha e analise os dados utilizando software apropriado. Antes de recolher os dados das amostras, ajuste o limiar, a fim de minimizar resíduos e de assegurar a integração de populações de interesse. A fig. 1 apresenta dados representativos efectuados em linfócitos capturados. A excitação por laser situa-se a 488 nm.

Fig. 1: Perfil de fluorescência, gates de dispersão fixados na plaquetas activadas (R1)



NOTA: A fixação inapropriada do *gate* nos dados da amostra pode originar resultados incorrectos.

Controlo de qualidade interno
Recomenda-se o uso dum controlo negativo (consultar o catálogo da Sanquin Reagents) a

fim de determinar a fluorescência de fundo produzida devido às capacidades de ligação de Fc pelas células mononucleares.
A concentração e o índice F/P destes controlos foram ajustados aos anticorpos monoclonais conjugados da Sanquin Reagents.

7. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Especificidade
O anticorpo monoclonal está dirigido contra o antígeno CD62P (selectina P, GMP-140 ou PADGEM), que se encontra expresso nos megacariócitos, nas células endoteliais e nos grânulos alfa plaquetários, e é deslocado para a superfície plaquetária após a activação com agonistas fortes (a massa molecular é de 140 kDa). Há uma proteína semelhante, derivada dos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais, que vem transitoriamente expressa à superfície das células endoteliais activadas. (7-10).

Sensibilidade
As sensibilidade é definida como uma resolução da população negativa CD da população positiva CD diferente. A sensibilidade foi medida por avaliação duma extensão de concentrações de anticorpos. Cada concentração foi testada em sangue total. A separação do CD positivo do CD negativo foi determinada por cada amostra e calibrada em cada concentração. A concentração de anticorpo dos recipientes apresentou, para cada um dos reagentes, uma sensibilidade óptima na determinação das células CD positivas das negativas.

Reprodutibilidade/Replicabilidade
Os CDs foram apresentados num dos Workshops Internacionais acerca da Diferenciação de Antígenos de Leucócitos Humanos ou preenchem as especificações do workshop (vide composição).

De forma a determinar a replicabilidade da marcação com cada reagente, as amostras foram marcadas com múltiplos lotes de reagentes. As diferentes amostras usadas na avaliação forneceram um valor médio de intensidade de fluorescência (IMF) conforme consta no quadro 2. Por cada amostra, foi gerado um par de resultados por dois lotes diferentes de reagentes. Os SDs individuais foram determinados a partir dos resultados emparelhados para cada amostra. Os SDs foram combinados de forma a derivar um SD conjunto por cada reagente, que forneça uma estimativa da replicabilidade da amostra.

Quadro 2. Replicabilidade da intensidade média da fluorescência (IMF) das células alvo nos diferentes lotes (N) e nos diferentes dadores.

	N *	Média da IMF	SD pooled	% CV pooled
FITC	1	74.72	0.40	0.54%
PE	4	317.6	69.5	21.9%

* N = número de amostras

8. LIMITAÇÕES
Os conjugados com fluorocromos mais brilhantes (PE, PE-Cy5) darão uma maior separação do que os que utilizam outros corantes (FITC). Quando as populações se sobrepõem, o cálculo da percentagem positiva para os marcadores pode ser afectado pela escolha do fluorocromo.

A utilização de anticorpos monoclonais no tratamento de pacientes pode interferir com o reconhecimento de antígenos alvo por este reagente. Isto deverá ser tomado em consideração ao analisar amostras de pacientes tratados por este método. A Sanquin Reagents não caracterizou o efeito da presença de anticorpos terapêuticos na actuação deste reagente.
Reagentes únicos podem fornecer unicamente uma informação limitada na análise de leucemia e de linfomas. A utilização duma combinação de outros reagentes e a aplicação de outros processos de diagnóstico pode fornecer mais informação do que apenas a aplicação destes reagentes. Recomenda-se vivamente a análise multicolor usando uma combinação relevante de reagentes.

Dado os reagentes poderem ser utilizados em diferentes combinações, os laboratórios precisam de se familiarizar com as propriedades de cada anticorpo em conjunto com outros marcadores em amostras normais e anormais.

O desempenho dos dados do reagente foi tipicamente recolhido com sangue tratado com EDTA. O desempenho do reagente pode ser afectado pelo uso de outros anticoagulantes.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Problema	Causa possível	Solução
Baixa resolução entre o ruído de fundo e os linfócitos	Interação celular com outras células e plaquetas	Preparar e marcar outra amostra
	Manipulação grosseira da preparação de células	Verificar a viabilidade celular; centrifugar células a uma velocidade baixa.
	Configuração inadequada dos Instrumentos	Seguir cuidadosamente as instruções de montagem: otimizar a configuração do instrumento conforme solicitado.
Marcação fraca ou desvanecente	Concentração celular demasiado elevada na altura da marcação	Verifique e ajuste a concentração celular ou o volume da amostra; marque com amostra fresca.
	Reagente insuficiente	Repita a marcação com uma quantidade aumentada de anticorpo.
	Células não analisadas nas 8 horas seguintes à marcação	Repita a marcação com amostra fresca; análise de imediato.
	Meio de preparação impróprio (omissão do conservante)	Use conservante no meio de marcação e nas fases da lavagem.
Poucas ou nenhuma células	Concentração celular demasiado baixa	Resuspender a amostra fresca a uma concentração mais elevada; repetir a marcação e a análise.
	Mau funcionamento do citómetro	Resolução de problemas do Instrumento

7 Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.*, **175**, 1147-50 (1992).

8 Skinner, M.P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**,73-76 (1989).

9 Skinner, M.P. et al., *J. Biol. Chem.*, **266**, 5371-74 (1991).

10 Modderman, P.W. et al., *Leucocyte Typing IV*, 1038 (1989).

BIBLIOGRAFIA

1 *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.

2 *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition;Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.

3 *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue: Tentative Guideline.* Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.

4 Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.

5 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.

6 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC; American Society for Microbiology; 1986:226-235.