

PeliCluster CD69

Monoclonal mouse anti-human reagent for identification of cells expressing CD69 antigen.

Form **REF** **Clone**
PE M2282 TP1.55.3

X0033-503eng 1112061459



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

Studies of cell activation and cellular responses to mitogenic and antigenic stimuli.

2. COMPOSITION

Clone TP1.55.3 has been derived from hybridisation of X63/Ag8.653 cells with spleen cells of a BALB/c mouse immunised with human PBL activated for 24 hours with PMA and anti-CD3 monoclonal antibody. This clone is of a mouse IgG2b subclass. The antibody is conjugated with R-phycoerythrin (PE). The molecular F/P ratio is between 1.0 – 2.0.

The antibodies were purified from tissue culture supernatant using column chromatography (affinity chromatography).

Reagent contents.

The reagent is supplied in 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing BSA 0.2% (w/v) and Na₂S 0.1% (w/v) as preservative (see table 1).

Table 1. Contents of bottles

PE	100 tests per ml in PBS
----	-------------------------

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, Sequestrene 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 K₃EDTA 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 (1x10⁸ cells/ml) 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.

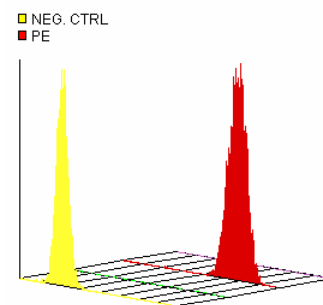
Analytical Results

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 the lymphocyte fraction (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 CD69 antigen, which is constitutively expressed on a subpopulation of thymocytes and platelets. The CD69 molecule (also designated as activation inducer molecule, AIM), is a phosphorylated disulfide-linked 27/33 kDa homodimer composed of differently glycosylated subunits. CD69 is a type II integral membrane protein with an extracellular C-type lectin domain. Upon activation of T cells, NK cells and B cells in vitro CD69 is the earliest inducible cell surface glycoprotein to appear. CD69 is involved in signal transduction during the initial steps of cell activation. CD69 is undetectable on most circulating peripheral blood lymphocytes. Resting T cells do not express CD69, but its expression may be rapidly induced by triggering the TCR/CD3 complex. The majority of peripheral blood NK cells are negative for CD69, but they express AIM shortly after activation with PMA, IL-2, alpha-interferon or CD16 monoclonal antibody. In NK cells and platelets CD69 acts as a triggering molecule. TP1.55.3 reacts with activated T lymphocytes but has a weak or no effect on the induction of T cell proliferation and IL-2 production, respectively. This monoclonal antibody immunoprecipitates the 60 kDa homodimer and both 27 kDa and 33 kDa subunits from PBL activated (with PMA and anti-CD3 mAbs) under reduced and non-reduced conditions, respectively (7-11).

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
PE	2	382.9	98.3	25.7%

* 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	Prepare and stain another sample.
	Rough handling of cell preparation Inappropriate instrument settings	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	Check and adjust cell concentration or sample volume; stain with fresh sample
	Insufficient reagent	Repeat staining with increased amount of antibody.
	Cells not analysed within 8 hours of staining Improper medium preparation (preservative omitted)	Repeat staining with fresh sample; analyse promptly. Use preservative in staining medium and washing steps.
Few or no cells	Cell concentration too low	Resuspend fresh sample at a higher concentration ; repeat staining and analysis.
	Cytometer malfunction	Troubleshoot instrument.

10 Testti, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., *J. Exp. Med.* **172**, 701-707, (1990).

11 Testi, R., d'Ambrosio, D., de Maria, R., Santoni, A., *Immunol. Today*, **15**, 479-483, (1994).

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 Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).

8 Cebrian, M., Yagüe, E., Rincon, M., Lopez-Bodet, M., de Landazuri, M.O., Sanchez-Madrid, F., *J. Exp. Med.* **168** 1621-1637 (1988).

9 Borrego, F., Galiani, M.D., Garcia-Cozar, F., Madueno, J.A., Perez-Bermejo, L., Santamaria, M., Pena, J., Solana, R., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).

PeliCluster CD69

Mischung aus monoklonalen Maus-Anti-Human-Reagenzien zur Identifizierung von Zellen, die das CD69 Antigen exprimieren.

Form	REF	Klon
PE	M2282	TP1.55.3

X0033-503dui 1112061459



1. VERWENDUNGSZWECK

Die PeliCluster Antikörper sind zur Verwendung für die Diagnostik *in vitro* bestimmt. Dieses Reagenz identifiziert und bestimmt CD-Antigen-exprimierende Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse. Zur Vermeidung von Wechselwirkungen mit Erythrozyten bei der Analyse wird eine Behandlung mit Lysereagenz (PeliLyse A1, Bestellnummer M7101.6) empfohlen. Das Durchflusszytometer muss mit einem Detektor für Erfassung von Lichtbeugung und -brechung und zur Messung der entsprechenden Fluoreszenz sowie mit geeigneter Software zur Datenerhebung und -analyse ausgestattet sein. Bitte beachten Sie hierzu die Gebrauchsanweisung Ihres Geräts.

Anwendungen

Untersuchung der Zellaktivierung und der zellulären Response auf mitogene und antigene Reize.

2. ZUSAMMENSETZUNG

Klon TP1.55.3 wurde durch Hybridisierung von X63/Ag8.653-Zellen mit Milzzellen einer BALB/c-Maus hergestellt, die mit menschlichen PBL nach 24-stündiger Aktivierung mit PMA und monoklonalem Anti-CD3-Antikörper immunisiert wurde. Die Antikörper dieses Klons gehören zur Maus-IgG2b-Subklasse. Der Antikörper ist mit R-Phycoerithrin (PE) konjugiert. Das molekulare F/P-Verhältnis beträgt zwischen 1,0 und 2,0.

Die Antikörper wurden mithilfe von Säulenchromatografie (Affinitäts-Chromatografie) aus Gewebekulturmedium gereinigt.

Bestandteile der Reagenzien

Das Reagenz befindet sich in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 0,2% (w/v) BSA und 0,1% (w/v) NaNs als Konservierungsmittel (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Inhalt der Flaschchen

PE	100 Tests pro ml in PBS-Puffer
----	--------------------------------

WARNHINWEIS:

Natriumazid ist bei Verschlucken schädlich (R22). Außerhalb der Reichweite von Kindern aufbewahren (S2). Nicht in Kontakt mit Lebensmitteln, Getränken und Tierfutter bringen (S13). Geeignete Schutzkleidung tragen (S36). Bei Verschlucken sofort einen Arzt hinzuziehen und diese Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen (S46). Bei Kontakt mit Säuren wird hoch toxisches Gas freigesetzt (R32). Bei der Entsorgung von Azidverbindungen in den Abfluss muss viel Wasser nachgespült werden, um mit Explosionsrisiko verbundene Ablagerungen in Blei- oder Kupferleitungen zu vermeiden.

3. AUFBEWAHRUNG UND HANDHABUNG

Das Antikörperreagenz ist bei Lagerung bei 2 bis 8°C bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil. Nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden. Reagenz während der Aufbewahrung oder bei der Inkubation mit Zellen nicht einfrieren oder direkter Sonneneinstrahlung aussetzen. Außenseite des Reagenzfläschchens trocken halten. Die Reagenzien sollten bei Anzeichen verminderter Qualität nicht mehr verwendet werden, z.B. wenn eine Erhöhung der Kompensation oder ein signifikanter Verlust an Reaktivität auftreten.

4. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFTE REAGENZIEN ODER MATERIALIEN

- Lyse-Lösung (PeliLyse, Bestellnummer M7101.6).
- Wasch- und Verdünnungspuffer für mononukleäre Zellen, phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,2% BSA (w/v) (PBS/BSA).
- Wasch- und Verdünnungspuffer für Thrombozyten, Sequestrine-Puffer (Seq), Lagerung 1 Monat bei 2 bis 8° C, 10 x Konzentrat, zum Auflösen in 1 Liter destilliertem Wasser:

NazHPO₄ · H₂O

:

31.3

g

NazEDTA · 2H₂O

:

33.3

g

NaCl

:

90.0

g
- Vor der Verdünnung in destilliertem Wasser BSA bis zu einer Endkonzentration von 0,2 % (w/v) zugeben. Mischen und pH-Wert auf 6,8 einstellen.
- Fixierungspuffer, PFA/BSA (*): Paraformaldehyd 1% in PBS, enthält 0,2% BSA (pH 7,2).
- Mikrotiter-Platten (96 Vertiefungen, V-Boden) oder Plastikröhrchen für die Durchflusszytometrie.
- Durchflusszytometer. Bitte beachten Sie hierzu die Gebrauchsanweisung Ihres Geräts.

(*) Formaldehyd dient als Fixierungsmittel. Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

5. PROBE(N)

Zur Vorbereitung von Blutproben für die Durchflusszytometrie können Verfahren zur Präparation von PBMC verwendet werden. Bei der Präparation von PBMC sind die Ergebnisse häufig von der angewandten Technik abhängig (1).

Blut aseptisch durch Venenpunktion (1,2) in sterile K₃EDTA-Blutabnahmeröhrchen abnehmen. Wird die Vollblutmethode angewandt, ist mindestens 1 ml Vollblut erforderlich. Blut, das mit Gerinnungshemmern versehen ist, bei Raumtemperatur aufbewahren (18 bis 25° C).

WARNHINWEIS:

Alle biologischen Proben und Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, sind als biogefährlich zu betrachten. Alle Proben sind als potenziell infektiös zu betrachten (3,4) und entsprechend den geltenden Richtlinien zu entsorgen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Geeignete Schutzkleidung und Handschuhe tragen. Berichten zufolge führt eine Fixierung zur Inaktivierung von HIV (5).

6. Vorgehensweise

A: Verfahren mit Ficoll-gereinigten Zellen.

- 1 Suspension mit mononukleären Zellen in einer Konzentration von 1 x 10⁷ Zellen/ml herstellen.
- 2 Jeweils 40 µl der Zellsuspension in die Vertiefung von Mikrotiterplatten oder in Teströhrchen geben.
- 3 Jeweils 10 µl der unverdünnten Antikörper zu den Vertiefungen der Mikrotiterplatten oder in die Teströhrchen geben und vorsichtig mischen.
- 4 30 Minuten bei 2 bis 8° C inkubieren.
- 5 Jeweils 150 µl Puffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten oder 2 ml Puffer in die Teströhrchen geben und bei 500 x g 5 Minuten lang zentrifugieren.
- 6 Überstand vom Zellpellet abnehmen und die Zellen resuspendieren.
- 7 Jeweils 200 µl Puffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten oder 2 ml Puffer in die Teströhrchen geben und bei 500 x g 5 Minuten lang zentrifugieren.
- 8 Überstand vom Zellpellet abnehmen und die Zellen resuspendieren.
- 9 Analyse im Durchflusszytometer: Jeweils 200 µl Puffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben und diese Zellsuspension in geeignete Teströhrchen überführen. Alternativ 200 µl Puffer in die Teströhrchen geben.
- 10 Kann die Analyse nicht innerhalb von 8 Stunden durchgeführt werden, muss bei Schritt 9 anstelle von Puffer 200 µl PFA 1% zugegeben werden. Sanquin Reagents empfiehlt, die Analyse daraufhin innerhalb von 24 Stunden durchzuführen.

B: Vollblutverfahren

- 1 Blut in ein Röhrchen mit EDTA abnehmen.
- 2 100 µl (*) des gut durchmischten Vollbluts in den Boden eines Teströhrchens geben.
- 3 10 µl der unverdünnten Antikörper in den Boden des Teströhrchens geben und 30 Sekunden lang kräftig mischen.
- 4 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 5 Röhrcheninhalt mischen und 2 ml Lyse-Lösung zugeben (PeliLyse A1, 10x verdünnt).

- 6 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, bis die Lyse abgeschlossen ist.
- 7 Proben innerhalb von 90 Minuten analysieren.

Kann die Analyse nicht innerhalb von 90 Minuten durchgeführt werden, werden die Röhrchen bei 500 x g 5 Minuten lang zentrifugiert. Überstand von dem Zellpellet abnehmen und die Zellen in 1 ml Puffer resuspendieren, wenn die Analyse innerhalb von 8 Stunden stattfindet. Ist dies nicht der Fall, Zellen in 1 ml PFA 1% resuspendieren. Sanquin Reagents empfiehlt, die Analyse daraufhin innerhalb von 24 Stunden durchzuführen.

* Dieses Verfahren wurde für Blutproben mit normaler Leukozytenzahl und für die Verwendung von PeliLyse A1 (Lyse-Lösung, Bestellnummer M7101.6) entwickelt. Bei Proben mit sehr hohen bzw. sehr niedrigen Leukozytenzahlen muss die Blutmenge gegebenenfalls entsprechend verändert werden.

C: Durchflusszytometrie und Mikroskopie der Thrombozytenmembran

1. Geben Sie 45 µl der Thrombozytensuspension (1 x 10⁸ Zellen/ml) in die Mikrotiterplatte oder in die Röhrchen und geben Sie 5 µl monoklonalen Antikörper dazu *. Vorsichtig mischen und 30 Minuten bei 2 bis 8° C inkubieren.
2. Das Waschen erfolgt durch Mischen und Zugabe von Sec zu der Mikrotiterplatte (erster Waschschritt 150µl, zweiter Waschschritt 200µl) oder zu den Röhrchen (2 ml). Zentrifugation der Mikrotiterplatten oder Röhrchen bei 100 x g für 5 Minuten und Aspiration des Überstands. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt.
3. Vorbereitung der Zellen für die Analyse: Für die Durchflusszytometrie werden die Zellen in der Mikrotiterplatte oder in den Röhrchen in 200 µl Seq resuspendiert. Bei Verwendung einer Mikrotiterplatte werden die Inhalte nun in die entsprechenden Röhrchen überführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie werden die Zellen in 50µl Einbettmedium resuspendiert, auf einen Objektträger überführt und auf diesen ein Deckglas gelegt.

* Generell sind 5µl unverdünnter monoklonaler Antikörper ausreichend. Alternativ kann eine optimale Verdünnung bestimmt werden. Zur Bestimmung von Hintergrundfluoreszenz muss stets eine Negativkontrolle desselben Isotyps verwendet werden.

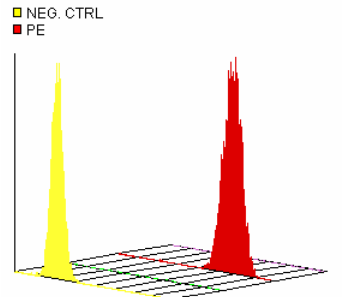
Analyseergebnisse

In manchen Krankheitsstadien ist die Anzahl der Zellen, die diese Antigene exprimieren bzw. übermäßig exprimieren, krankhaft erhöht. Für die Durchführung einer angemessenen Analyse ist es daher wichtig, das normale Expressionsmuster für diese Antigene und ihren Zusammenhang mit der Expression anderer relevanter Antigene zu kennen.

Durchflusszytometrie

Die Zellen bei niedriger Geschwindigkeit gründlich auf dem Vortex mischen, damit sie vor der Analyse im Durchflusszytometer keine Aggregate bilden (6). Daten mit Hilfe geeigneter Software im „List-mode“-Verfahren messen und analysieren. Vor der Datenerhebung muss der Schwellenwert eingestellt werden, damit so wenig Verunreinigungen wie möglich und die gewünschten Populationen in die Messung aufgenommen werden. Abb. 1 zeigt Beispieldaten nach Einstellung des Analysefenster für Lymphozyten („gating“). Die Laserexzitation beträgt 488 nm.

Abb. 1: Fluoreszenzprofil, Analysefenster eingestellt auf die Lymphozytenfraktion (R1).



HINWEIS: Wird nicht das richtige Analysefenster für die Probandaten eingestellt, sind auch die Ergebnisse möglicherweise nicht korrekt.

Interne Qualitätskontrolle

Zur Bestimmung von Hintergrundfluoreszenz, die durch Fc-bindende Eigenschaften mononukleärer Zellen hervorgerufen wird, wird die Verwendung einer Negativkontrolle (siehe die Reagenzien im Sanquin-Katalog) empfohlen. Die Konzentration und das F/P-Verhältnis dieser Kontrollen wurde auf die konjugierten monoklonalen Antikörper der Sanquin Reagenzien abgestimmt.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Spezifität

Der monoklonale Antikörper ist gegen das CD69-Antigen gerichtet, das konstitutiv auf einer Subpopulation von Thymozyten und Thrombozyten exprimiert ist. Das CD69-Molekül (wird auch als aktivierungsinduzierendes Molekül, AIM, bezeichnet) ist ein phosphoryliertes, durch Disulfidbrücken verbundenes Homodimer mit 27/33 kDa, das aus unterschiedlich glykosylierten Untereinheiten besteht. CD69 ist ein integrales Membranprotein vom Typ II mit einer extrazellulären Lektindomäne vom Typ C. CD 69 ist das erste Oberflächenglykoprotein, das nach Aktivierung von T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen *in vitro* erscheint. CD69 ist Teil der Signalübertragung, die während der ersten Schritte der Zellaktivierung abläuft. Auf den meisten zirkulierenden peripheren Blutlymphozyten ist es nicht nachweisbar, ruhende T-Zellen exprimieren CD69 nicht, die Expression kann jedoch schnell durch Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes induziert werden. Die meisten NK-Zellen im peripheren Blut sind negativ für CD69, sie exprimieren AIM jedoch kurz nach Aktivierung mit PMA, IL-2, Alfa-Interferon oder monoklonalem Antikörper gegen CD16. In NK-Zellen und Thrombozyten wirkt CD69 als Triggermolekül. TP1.55.3 reagiert mit aktivierten T-Lymphozyten, hat jedoch nur schwache Wirkung auf die Induktion der T-Zellproliferation und keine Wirkung auf die IL-2-Produktion. Dieser monoklonale Antikörper immunpräzipitiert das 60 kDa-Homodimer und die 27 kDa- bzw. die 33 kDa-Untereinheit von PBL, die unter reduzierten bzw. nicht reduzierten Bedingungen aktiviert wurden (mit PMA und Anti-CD3-mAb).

Sensitivität

Die Sensitivität ist definiert als Fähigkeit zur Unterscheidung der CD-negativen Population von der unterschiedlichen CD-positiven Population. Die Sensitivität wurde gemessen, indem eine Reihe von Antikörperkonzentrationen evaluiert wurde. Jede Konzentration wurde an Vollblut gemessen. In jeder Probe wurde die CD-positive gegenüber der CD-negativen Population bestimmt und für jede Konzentration der Mittelwert dieser Messungen bestimmt. Die in den Fläschchen vorhandene Antikörperkonzentration gewährleistet optimale Sensitivität zur Unterscheidung von CD-positiven und -negativen Zellen.

Reproduzierbarkeit/Wiederholbarkeit.

Die CDs wurden bei einem der internationalen Workshops über Differenzierungsantigene von menschlichen Leukozyten (International Workshops on Human Leukocyte Differentiation Antigens) eingereicht bzw. erfüllen die Spezifikationen des Workshops (siehe Angaben zur Zusammensetzung).

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit der Färbung mit jedem Reagenz wurden die Proben jeweils mit mehreren Chargen angefärbt. Die unterschiedlichen Proben, die bei der Evaluierung verwendet wurden, ergaben die in Tabelle 2 gezeigte, mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Für jede Probe ergaben sich durch Verwendung zweier unterschiedlicher Reagenzchargen zwei Ergebnisse. Aus den paarweisen Ergebnissen für jede Probe wurde die Standardabweichung (SD) bestimmt. Die SDs wurden kombiniert und so für jedes Reagenz eine gepoolte SD erhalten, die einen Schätzwert für die Wiederholbarkeit der Messung einer Probe angibt.

Tabelle 2: Wiederholbarkeit der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von Zielzellen bei Verwendung unterschiedlicher Chargen (N) und Proben mehrerer Spender.

	N *	Durchschnittl. MFI	gepoolte SD	gepoolter% KV
PE	2	382.9	98.3	25.7%

* 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

	Durchflussszytometer.	durchführen.
--	-----------------------	--------------

QUELLENANGABE

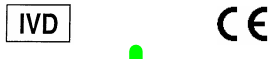
- Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.* Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards;1998. NCCLS document H42-A.
- Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Fourth Edition;Approved Standard.* Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H3-A4.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).
- Cebrian, M., Yagüe, E., Rincon, M., Lopez-Bodet, M., de Landazuri, M.O., Sanchez-Madrid, F., *J. Exp. Med.* 168 1621-1637 (1988).
- Borrego, F., Galiani, M.D., Garcia-Cozar, F., Madueno, J.A., Perez-Bermejo, L., Santamaria, M., Pena, J., Solana, R., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).
- Testti, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., *J. Exp. Med.* 172, 701-707, (1990).
- Testi, R., d'Ambrosio, D., de Maria, R., Santoni, A., *Immunol. Today*, 15, 479-483, (1994).

PeliCluster CD69

Réactifs monoclonaux murins anti-humains pour l'identification des cellules exprimant l'antigène CD69.

Forme	REF	Clone
PE	M2282	TP1.55.3

X0033-503fra 1112061459



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

Études sur l'activation des cellules et les réponses cellulaires aux stimuli mitogéniques et antigéniques.

2. COMPOSITION

Le clone TP1.55.3 a été dérivé par hybridation de cellules X63/Ag8.653 avec des cellules de rate d'une souche BALB/c immunisée avec des PBL humains activés pendant 24 heures avec des PMA et l'anticorps monoclonal anti-CD3. Ce clone appartient à une sous-classe d'IgG2b murines.

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 de surnageant de culture tissulaire par chromatographie sur colonne (chromatographie d'affinité).

Ingrédients du réactif

Le réactif est fourni dans 1 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), contenant de l'ASB (0,2 % p/v) et du NaN₃ (0,1 % p/v) servant de conservateurs (voir le tableau 1).

Tableau 1. Contenu des flacons

PE	100 tests par ml dans du PBS
----	------------------------------

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.

3. 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.

4. 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. Éviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

5. 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 K₃EDTA. 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 anti-coagulé 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).

6. PROCEDURES

A: Méthode avec cellules purifiées ficoll

- 1 Préparer une suspension de cellules mononucléées à une concentration de 1 x 10⁷ 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 (1 x 10⁸ cellules/ml) 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.

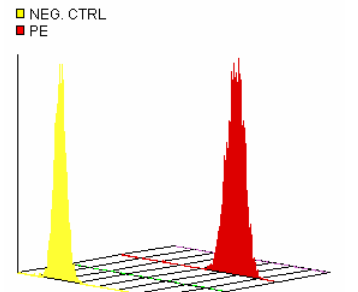
Résultats de l'analyse

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 la fraction lymphocytaire (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 conjugués de Sanquin Reagents.

7. PERFORMANCES

Spécificité

L'anticorps monoclonal est dirigé contre l'antigène CD69 qui est exprimé principalement sur une sous-population de thymocytes et de plaquettes. La molécule CD69 (également appelée molécule inductrice d'activation, AIM) est un homodimère de 27 à 33 kDa avec liaison de disulfure phosphorylée, composé de sous-unités glycosylées différemment. CD69 est une protéine membranaire intégrale de type II avec un domaine de lectine de type C extracellulaire. Après activation in vitro des lymphocytes T, des cellules NK et des lymphocytes B, CD69 est la première glycoprotéine de surface inducible qui apparaît. CD69 est impliqué dans la transduction de signal lors des premières étapes de l'activation des cellules. CD69 est indétectable sur la plupart des lymphocytes de sang périphérique. Les lymphocytes T au repos n'expriment pas CD69, mais son expression peut être rapidement induite en déclenchant le complexe TCR/CD3. La majorité des cellules NK de sang périphérique sont négatives pour CD69 ; en revanche, elles expriment l'AIM peu après l'activation avec des PMA, IL-2, l'interféron alfa ou l'anticorps monoclonal CD16. CD69 agit comme une molécule de déclenchement dans les cellules NK et les plaquettes. TP1.55.3 réagit avec lymphocytes T activés mais a peu ou pas d'effet sur l'induction de la prolifération de lymphocytes T et la production d'IL-2. Cet anticorps monoclonal immunoprécipite l'homodimère de 60 kDa et les sous-unités de 27 kDa et 33 kDa à partir de PBL activés (avec des PMA et de l'anticorps monoclonal anti-CD3) respectivement dans des conditions réductrices et non-réductrices (7-11).

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
PE	2	382,9	98,3	25,7%

* N = nombre d'échantillons

8. 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.

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

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.

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 Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., Leucocyte Typing V, Oxford University Press, 1133-1136, (1995).

8 Cebrian, M., Yagüe, E., Rincon, M., Lopez-Bodet, M., de Landazuri, M.O., Sanchez-Madrid, F., J. Exp. Med. 168 1621-1637 (1988).

9 Borrego, F., Galiani, M.D., Garcia-Cozar, F., Madueno, J.A., Perez-Bermejo, L., Santamaria, M., Pena, J., Solana, R., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., Leucocyte Typing V, Oxford University Press, 1133-1136, (1995).

10 Testti, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., J. Exp. Med. 172, 701-707, (1990).

11 Testi, R., d'Ambrosio, D., de Maria, R., Santoni, A., Immunol. Today, 15, 479-483, (1994).

PeliCluster CD69

Reagenti monoclonali murini diretti contro antigeni umani per l'identificazione di cellule che esprimono l'antigene CD69.

Modello	REF	Clone
PE	M2282	TP1.55.3

X0033-503ita 1112061459



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

Studi di attivazione cellulare e di risposta cellulare a stimoli fitogenici ed antigenici,

2. COMPOSIZIONE

Il clone TP1.55.3 deriva dall'ibridizzazione di cellule X63/Ag8.653 con splenociti di un topo BALB/c immunizzato con PBL umano attivato per 24 ore con PMA ed un anticorpo monoclonale anti CD3. Il clone appartiene alla sottoclasse IgG2b delle immunoglobuline murine. L'anticorpo è coniugato con la R-ficoeritrina (PE). Il rapporto molecolare F/P è compreso tra 1 e 2.

Gli anticorpi sono stati purificati da terreni di coltura utilizzando la tecnica cromatografica (cromatografia di affinità).

Contenuto del reagente

Il reagente è fornito in 1 ml di tampone fosfato isotonic (PBS) contenente BSA 0,2% (p/v) e Na₂S₂O₃ 0,1% (p/v) come conservante (vedi tabella 1).

Tabella 1. Contenuto delle bottiglie	
PE	100 test per ml in PBS

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 Sequestre (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).
- Piastre 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 citometrica: Aggiungere 200 μ l di tampone ai pozzetti delle piastre 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 (1×10^5 cellule/ml) 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.

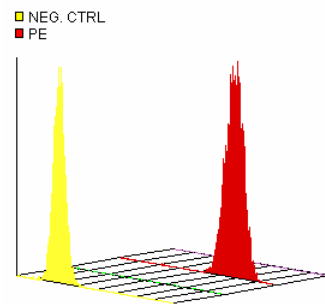
Risultati analitici

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 frazione di linfociti (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 CD69 espresso costitutivamente da una sottopopolazione di timociti e piastrine. La molecola CD69 (denominata anche molecola induttrice di attivazione - AIM) è un omodimero fosforilato con legame disolfuro (27/33kDa) composto da subunità

differentemente fosforilate. Il CD69 è una proteina di membrana integrale di tipo II con un dominio di lectina extracellulare di tipo C. In seguito all'attivazione in vitro di cellule T, B ed NK, il CD69 è la prima glicoproteina di membrana inducibile ad apparire sulla superficie cellulare. Il CD69 è coinvolto nella traduzione del segnale durante le prime fasi dell'attivazione cellulare. Tale molecola non è rilevabile sulla maggior parte dei linfociti periferici circolanti. Le cellule T⁺ resting non esprimono il CD69 anche se questo può essere rapidamente indotto dal complesso TCR/CD3. La maggioranza delle cellule NK del sangue periferico non esprimono il CD69 ma l'espressione di quest'ultimo inizia subito dopo l'attivazione con PMA, IL-2, interferone alfa o anticorpo monoclonale CD16. Nelle cellule NK e nelle piastrine il CD69 agisce come molecola scatenante. TP1.55.3 reagisce con i linfociti T⁺ attivati, ma ha un effetto debole o assente rispettivamente sull'induzione della proliferazione di tali cellule e sulla produzione di IL-2. Tale anticorpo immunoprecipita sia l'omodimero da 60 kDa che le due subunità da 27 kDa e 33 kDa dal PBL attivato (con PMA ed anticorpi monoclonali anti CD3) rispettivamente in condizioni riducenti e non riducenti (7-11).

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
PE	2	382.9	98.3	25.7%

* 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 piastrene	Preparare e colorare un altro campione.
	Manipolazione grossolana della preparazione cellulare	Verificare la vitalità cellulare, centrifugare le cellule a velocità inferiori.
	Impostazione dello strumento non adatta.	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	Verificare ed aggiustare la concentrazione cellulare o il volume del campione; colorare con campione fresco.
	Reagente insufficiente	Ripetere la colorazione con una maggiore quantità di anticorpo.
	Cellule non analizzate entro 8 ore dalla colorazione	Ripetere la colorazione con campione fresco; analizzare immediatamente.
	Preparazione del medium non adatta (senza conservante)	Utilizzare il conservante nel terreno di colorazione e durante i lavaggi.
Poche cellule o assenza di cellule	Concentrazione cellulare troppo bassa	Risospendere il campione fresco ad una concentrazione maggiore; ripetere la colorazione e l’analisi.
	Cattivo funzionamento del citometro	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 Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press,* 1133-1136, (1995).

8 Cebrian, M., Yagüe, E., Rincon, M., Lopez-Bodet, M., de Landazuri, M.O., Sanchez-Madrid, F., *J. Exp. Med.* 168 1621-1637 (1988).

9 Borrego, F., Galiani, M.D., Garcia-Cozar, F., Madueno, J.A., Perez-Bermejo, L., Santamaria, M., Pena, J., Solana, R., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press,* 1133-1136, (1995).

10 Testti, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., *J. Exp. Med.* 172, 701-707, (1990).

11 Testi, R., d'Ambrosio, D., de Maria, R., Santoni, A., *Immunol. Today*, 15, 479-483, (1994).

PeliCluster CD69

Reactivos monoclonales de ratón antihumanos para la identificación de células que expresan el antígeno CD69.

Forma	REF	Clon
PE	M2282	TP1.55.3

X0033-503spa 1112061459



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

Estudios de activación celular y respuestas celulares a estímulos mitogénicos y antígenicos.

2. COMPOSICIÓN

El clon TP1.55.3 se obtuvo por hibridación de células X63/Ag8.653 con células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con PBL humanos activados durante 24 horas con PMA y anticuerpos monoclonales anti-CD3. Este clon pertenece a la subclase IgG2b de ratón. El anticuerpo está conjugado con R-ficocitrina (FE). La proporción de moléculas F/P oscila entre 1,0 y 2,0.

Los anticuerpos se purificaron del sobrenadante del cultivo de tejidos por cromatografía en columna (cromatografía de afinidad).

Contenido de los reactivos.

El reactivo se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) con BSA al 0,2% (p/v) y NaNs 0,1% (p/v) como conservante (véase la tabla 1).

Tabla 1. Contenido de los frascos

PE	100 ensayos/ml en PBS
----	-----------------------

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 (11).

Recoger sangre de forma aséptica por venipunción (1,2) en un tubo de muestras estéril con K₃EDTA. 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:

Además 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 (1 x 10⁸ células/ml) 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.

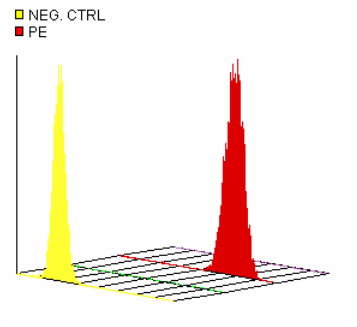
Resultados del análisis

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 incluyan 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 la fracción de linfocitos (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 CD69, que se expresa de forma constitutiva en una subpoblación de timocitos y plaquetas. La molécula CD69, también designada molécula inductora de activación (AIM), es un homodímero fosforilado con enlace disulfuro de 27/33 kDa, compuesto de subunidades con distinto grado de glicosilación. El CD69 es una proteína integral de membrana tipo II, con un dominio extracelular de lectina

tipo C. Tras la activación de los linfocitos T, NK y B in vitro, el CD69 es la primera glicoproteína inducible de la superficie celular que aparece. El CD69 participa en la transducción de señales durante los pasos iniciales de la activación celular. El CD69 no se detecta en la mayoría de los linfocitos de sangre periférica circulantes. Los linfocitos T en reposo no expresan el CD69, pero su expresión se puede inducir rápidamente activando el complejo TCR/CD3. La mayoría de las células NK de sangre periférica son negativas para CD69, pero expresan AIM poco tiempo después de su activación con PMA, IL-2, interferón alfa o el anticuerpo monoclonal CD16. En las células NK y las plaquetas, el CD69 actúa como molécula activadora. El TP1.55.3 reacciona con los linfocitos T activados, pero tiene un efecto débil o ningún efecto para inducir la proliferación de los linfocitos T y la producción de IL-2, respectivamente. Este anticuerpo monoclonal inmunoprecipita al homodímero de 60 kDa y a las subunidades de 27 kDa y 33 kDa de los linfocitos de sangre periférica (PBL) activados (con PMA y anti-CD3 mAbs), en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente (7-11).

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
PE	2	382.9	98.3	25.7%

* 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.
Pocas células o ausencia de células	Preparación incorrecta del medio (omisión del conservante)	Utilizar conservante en el medio de tinción y en el paso de lavado.
	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

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 Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press,* 1133-1136, (1995).

8 Cebrian, M., Yagüe, E., Rincon, M., Lopez-Bodet, M., de Landazuri, M.O., Sanchez-

Madrid, F., *J. Exp. Med.* **168** 1621-1637 (1988).

9 Borrego, F., Galiani, M.D., Garcia-Cozar, F., Madueno, J.A., Perez-Bermejo, L., Santamaria, M., Pena, J., Solana, R., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press,* 1133-1136, (1995).

10 Testi, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., *J. Exp. Med.* **172**, 701-707, (1990).

11 Testi, R., d'Ambrosio, D., de Maria, R., Santoni, A., *Immunol. Today*, **15**, 479-483, (1994).

PeliCluster CD69

Reagentes monoclonais, anti-humanos, de rato, para a identificação de células que expressam os antígenos CD69.

Forma	REF	Clone
PE	M2282	TP1. 55. 3

X0033-503por 1112061459



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

Estudos de activação celular e respostas celulares aos estímulos mitogénicos e antigénicos.

2. COMPOSIÇÃO

O clone TP1.55.3 derivou da hibridação de células X63/Ag8.653 com células de baço dum rato BALB/c imunizado com PBL humano, activadas ao longo de 24 horas com PMA e anticorpo monoclonal anti-CD3. Este clone é duma subclasse IgG2b de rato. O anticorpo está conjugado com R-ficoeritrina (FE). O índice molecular F/P situa-se entre 1,0 – 2,0.

Os anticorpos foram purificados do sobrenadante da cultura de tecido utilizando cromatografia de coluna (cromatografia por afinidade).

Teor dos reagentes

O reagente é fornecido em 1 ml de fosfato salino tamponado (FST) contendo ASB 0,2% (w/v) e Na₂O₃ 0,1% (w/v) como conservante (ver Quadro 1).

Quadro 1. Teor dos frascos

PE	100 testes por ml em FST
----	--------------------------

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*

- Preparar uma suspensão celular mononuclear com uma concentração de 1 x 10⁷ células/ml.
- Adicionar 40 µl de suspensão celular aos recipientes de microtitulação ou aos tubos.
- Adicionar 10 µl de anticorpo não diluído aos recipientes de microtitulação ou aos tubos e misturar com cuidado.
- Incubar durante 30 minutos entre 2 e 8 °C.
- 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.
- Aspirar o sobrenadante do *pellet* celular e resusper as células.
- 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.
- Aspirar o sobrenadante do *pellet* celular e resusper as células.
- 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.
- Se não for possível efectuar a análise dentro de 8 horas, adicionar no nº 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

- Colher sangue para um tubo de colheita de sangue contendo EDTA.
- Verter para o fundo do tubo de ensaio 100 µl (*) de sangue total bem misturado.
- Adicionar no fundo do tubo de ensaio 10 µl dos anticorpos não diluídos, e misturar com firmeza durante 30 segundos.
- Incubar durante 15 a 30 minutos à temperatura ambiente.
- Misturar os tubos e adicionar 2 ml de solução de lise (PeliLyse A1, diluída 10x).
- Incubar durante 10 a 15 minutos à temperatura ambiente, até a lise estar completa.
- 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 resusper 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.

- Transferir 45 µl de suspensão plaquetária (1 x 10⁸ células/ml) 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.
- 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.
- Preparar as células para análise:

Para a citometria de fluxo, resusper 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, resusper 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.

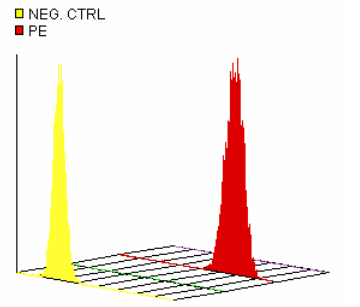
Resultados analíticos

Pode-se esperar encontrar alguns 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 fracção linfocitária (R1)



NOTA: A fixação inapropriada da *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 CD69, que está constitutivamente expresso numa subpopulação de timócitos e plaquetas. A molécula CD69 (também designada como molécula indutora da activação, MIA) é um homodímero de ligação

dissulfídica 27/33 kDa fosforilado, composto por subunidades diferentemente glicosiladas. CD69 é uma proteína de membrana integral tipo II com um domínio extracelular de lectina tipo C. Após a activação de células T, células NK e células B, a CD69 *in vitro* é a primeira glicoproteína induzível de superfície celular a aparecer. A CD69 está envolvida na transdução de sinal durante os passos iniciais da activação celular. A CD69 não é detectável na maior parte dos linfócitos do sangue periférico. As células T em repouso não exprimem CD69, mas a sua expressão pode ser rapidamente induzida por estimulação do complexo TCR/CD3. A maioria das células NK do sangue periférico são negativas para CD69, mas expressam MIA pouco depois da activação com PMA, IL-2, alfa-interferão ou anticorpo monoclonal CD16. Nas células NK e nas plaquetas, a CD69 actua como uma molécula desencadeadora. TP1.55.3 reage com os linfócitos T activados, mas tem um efeito fraco, ou nulo, na indução da proliferação de células T e na produção de IL-2 respectivamente. Este anticorpo monoclonal imunoprecipita o homodímero 60 kDa e ambas as subunidades 27 kDa e 33 kDa de PBL activada (com PMA e anti-CD3 mAbs) sob condições reduzidas e não reduzidas, respectivamente (7-11).

Sensibilidade

A 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
PE	2	382.9	98.3	25.7%

* 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 inapropriada 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.
Poucas ou nenhuma células	Meio de preparação impróprio (omissão do conservante)	Use conservante no meio de marcação e nas fases da lavagem.
	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

Washington, DC; American Society for Microbiology; 1986:226-235.

7 Lopez-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernandez-Ruiz, E., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).

8 Cebrian, M., Yagüe, E., Rincon, M., Lopez-Bodet, M., de Landazuri, M.O., Sanchez-Madrid, F., *J. Exp. Med.* **168** 1621-1637 (1988).

9 Borrego, F., Galiani, M.D., Garcia-Cozar, F., Madueno, J.A., Perez-Bermejo, L., Santamaria, M., Pena, J., Solana, R., et al., Schlossman, S.F. (editor) et al., *Leucocyte Typing V, Oxford University Press*, 1133-1136, (1995).

10 Testti, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., Santoni, A., *J. Exp. Med.* **172**, 701-707, (1990).

11 Testi, R., d'Ambrosio, D., de Maria, R., Santoni, A., *Immunol. Today*, **15**, 479-483, (1994).