



A Thermo Fisher Scientific Brand

PRODUCT INSERT

Lambda Monoclonal HLA Class I and Class II Tissue Typing Trays



Catalog # LM144, LM144A, LM144B, 2LM72, LM172, LM272, LM372, LM72OR, LM96, LMB2701, LMB2703, LMBL72, MDR160, MDR172, MDR272



For In Vitro Diagnostic Use.

INTENDED USE



For use in determining HLA Class I and Class II cell surface antigens with a complement dependent microlymphocytotoxic technique.

SUMMARY AND EXPLANATION

The HLA Class I and Class II Lambda Monoclonal Typing (LMT™) Trays contain a mixture of known monoclonal reagent and rabbit complement which are used to determine the presence of HLA Class I or II antigens on T and B lymphocytes. Each well contains 1 microliter (1 µl) of a specific monoclonal and complement mixture, as well as 5 microliters (5 µl) of heavy mineral oil. Each tray contains a positive and negative control. The Class II typing trays also include an anti-B and anti-T lymphocyte monoclonal antibody.

PRINCIPLE(S)

Viable lymphocytes are incubated with a mixture of complement-binding monoclonal antibodies and complement. If the lymphocytes express an antigen recognized by a specific antibody, the Fab portion of the antibody binds to the antigen, forming an antigen-antibody complex. After these complexes have formed, the C1q and Ca⁺⁺ from the complement binds to the FC portion of the antibody. One IgM antibody is required to bind one molecule of C1q or two IgG antibodies are required to bind one molecule of C1q. Binding of C1q initiates the complement cascade, which leads to cell lysis with antigen antibody complexes. In a negative reaction, the lymphocytes remain viable. In a positive reaction, the lymphocytes are dead.

REAGENTS

A. Identification

The HLA Class I or Class II Lambda Monoclonal Typing Trays contain a mixture of anti-Class I or Class II monoclonal antibody and rabbit complement. Each well contains 1 µl of a specific monoclonal and complement mixture and 5 µl of heavy mineral oil.

Note: Sources of monoclonal may be mouse or human.



B. Warning or Caution

1. For In Vitro Diagnostic Use
2. **Warning:** All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test method can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents.
3. **Warning:** Ethidium bromide is a known carcinogen. Handle with appropriate caution. Can be harmful if absorbed through skin. Avoid splashing in eyes or on skin or clothing. Keep tightly sealed. Wash thoroughly after handling.
4. Refer to the Safety Data Sheet for detailed information.



C. Preparing Reagents for Use

1. See "Directions for Use".





D. Storage Instructions

Store reagents at temperature indicated on package. Use before printed expiration date.

E. Purification or Treatment Required for Use

See "Directions for Use."

F. Instability Indications

Bacterial contamination and/or exposure to carbon dioxide will cause the sera to change pH. This pH change is indicated by a change in color from pink to yellow. If such a change occurs, discard trays.

INSTRUMENT REQUIREMENTS

- Not Applicable.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Since viable lymphocytes are required for serological typing, blood should be received and processed immediately following procurement. Lymphocyte yield decreases with time and extreme temperature. Blood should be collected in acid citrate dextrose (ACD) or sodium heparin, stored horizontally at room temperature (20 - 25° C), and processed within 48 hours for maximum T and B lymphocyte yield.

PROCEDURE

A. Materials Provided

1. HLA Class I or Class II typing tray(s), 60 or 72 well
2. Worksheets identifying the specificity of each monoclonal antibody

B. Materials Required, But Not Provided

1. Microsyringes
2. Insta-Seal™ (OLI Cat. # TIS250U) cover slides or glass slides and petrolatum (Vaseline™)
3. Stain and Fix reagents:
 - a. **For dye exclusion testing:** Eosin-Y (sodium base) and Formaldehyde, or Stain-Fix™ (OLI Cat. # SF-500)
 - b. **For fluorescence testing:** FluoroQuench™ AO/EB (OLI Cat. # FQAE-500), or FluoroQuench™ EB (OLI Cat. # FQEB-500), or add 1 ml EB stock solution to 9 ml hemoglobin or 1% ink (see Materials #s 4 - 7 below).
4. Hemoglobin Quench
 - a. **From lyophilized bovine serum:**
 - Dissolve 10 gm hemoglobin in 100 ml 5% EDTA PBS. Add 1 ml of 1% Sodium Azide.
 - Centrifuge for 45 minutes at 1000 g. Store supernatant at -20°C.
 - b. **From whole red cells:**
 - Stock solution: Wash packed RBC 3 times with saline. Make a 70% hematocrit and freeze and thaw. Ultracentrifuge for 45 minutes at 20,000 g. Dialyze 3 days against saline.
 - Working solution: Add 10ml 5% EDTA PBS. Add 1 ml 1% sodium azide to 89ml hemoglobin. Store at -20° C.
5. 1% Ink Working Quench
 - a. Dissolve 1 gm Bovine Serum Albumin (BSA) in 10 ml 5% EDTA PBS.
 - b. To 9.8 ml BSA/5% EDTA/PBS add:
 - 100 µl 1% Sodium Azide
 - 100 µl Higgins Black Calligraphy Ink
6. 5% EDTA (disodium) PBS
 - a. Dissolve 5 gm EDTA in 90 ml PBS.
 - b. Adjust pH to 7.2 with 10 M NaOH.
 - c. Bring final volume to 100 ml with PBS.

7. Ethidium Bromide (EB) Stock Solution: Dissolve 50 mg in 1 ml distilled water. Add 49 ml PBS. Heat in water bath at 56° C for 30 minutes. Store at -20° C.
8. Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA)
 - a. Stock solution: Dissolve 10 mg CFDA in 1 ml acetone in a glass tube. Store at -20° C in Beckman tubes.
 - b. Working solution: Use either of the following:
 - Prepared in PBS at pH 7.2: Add 30 µl CFDA stock solution to 5 ml PBS (pH 7.2). Store at 2 - 5° C for up to 1 week.
 - Prepared in PBS at pH 5.5: Add 30 µl CFDA stock solution to 5 ml PBS (pH 5.5). Store at 2 - 5° C for up to 1 week.

C. Directions for Use

Note: For lymphocyte isolation methods, refer to the *ASHI Laboratory Procedure Manual⁵* or the product insert for *One Lambda FluoroBeads®* or *LymphoKwik®* for lymphocyte isolation methods.

A. Testing

1. Thaw trays at room temperature (20 - 25°C) for 15 minutes, and use within 1 hour of thawing.
Caution: Do not refreeze.
2. To each well, add 1 µl of a 2×10^6 cells/ml suspension of either T or B lymphocytes to the Class I tray or B lymphocytes to the Class II tray. For fluorescence testing using CFDA, see part "B" below.
3. Mix the microdroplets together using an electrostatic mixer or a wire.
4. Incubate the trays at room temperature (20 - 25° C) for 1 hour.
5. After incubation, stain and fix the cells:
 - a. For dye exclusion testing, add to each well:
 - (1) 5 µl of eosin dye, followed 2 minutes later by 5 µl per well of formaldehyde, or
 - (2) 10 µl of Stain-Fix™ (OLI Cat. # SF-500).
 - b. For fluorescence testing, add 5 µl of FluoroQuench™ AO/EB (OLI Cat. # FQAE-500). For CFDA Testing (part "B" below), add 5 µl of FluoroQuench™ EB (OLI Cat. # FQEB-500) to each well, or add 50 µl Ethidium Bromide per ml of hemoglobin quench or 1% ink quench. Add 5 µl per well.
6. Cover the trays with Terasaki Insta-Seal™ (OLI Cat. # TIS250U). If a glass slide is used instead, seal with melted petrolatum. Let trays stand at 20 - 25°C for 15 minutes to allow lymphocytes to settle. Dye exclusion trays may be stored at 2 - 5°C for up to 2 weeks. Fluorescent trays may be stored at 2 - 5°C in the dark for up to 2 days. Trays covered with Terasaki Insta-Seal™ cover slides must be read the same day they are prepared for testing.

B. Fluorescence: CFDA Labeling of Lymphocyte Preparation

1. Incubate lymphocytes in 500 µl CFDA pH 7.2 at 37° C for 15 minutes or CFDA pH 5.5 for 5 minutes at 20 - 25° C. For lymphocytes isolated with magnetic beads, incubate in 500 µl CFDA pH5.5 at 20 - 25° C for 10 minutes.
2. Centrifuge for 1 minute at 1000 g. Remove supernatant. For lymphocytes isolated with magnetic beads, place on magnet for 1 minute. Remove supernatant.
3. Resuspend in PBS.
4. Repeat Steps 2 and 3 twice.
5. Resuspend cells in McCoy's with 0.5% FCS, and adjust the cells to a concentration of 2×10^6 cells/ml. Protect from light.
6. Follow Steps 2 - 6 of "Testing" above.

RESULTS

A. Data Acquisition

1. Cell death will occur in any test well where the HLA cell surface antigen is recognized by its matched anti-HLA antibody. When dye exclusion is used, negative (live) lymphocytes appear small, bright, and refractile. Positive (dead) lymphocytes appear dark and non-refractile with eosin dye. The reactions are scored by estimating the percentage of cell death.

B. Data Analysis

1. For fluorescence testing using carboxyfluorescein diacetate (CFDA) or Acridine Orange (AO), the negative (live) lymphocytes appear green. Using Ethidium Bromide (EB) or Propidium Iodide (PI), the positive (dead) lymphocytes appear red.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Cell isolation difficulties and contamination of the lymphocyte preparation with red cells, yeast, monocytes, platelets or granulocytes may cause erroneous results. Additionally, erroneous results may occur when cell concentrations are above or below the acceptable level. Bacterial contamination or change in pH of the monoclonal reagents may cause false negative reactions. Certain HLA antigens often exhibit weak specificities. These are called cross-reacting antigens and are detailed by antigens and antibodies from each tray in the enclosed reaction pattern guide sheet.
- On Class II typing trays, the anti-B lymphocyte control must be positive in order to validate that the cell preparation is B lymphocyte-enriched. If this control is less than a reaction score of 6, the test is not valid.

EXPECTED VALUES

Microscopic Evaluation Of Tests

The reactions are scored by estimating the percentage of cell death. If the negative control contains dead lymphocytes, the percentage of cell death in the remaining wells have to be adjusted accordingly.

The ASHI reading standard is shown in the following table:

<u>Score</u>	<u>Cell Death</u>	<u>Interpretation</u>
1	0-10%	Negative
2	11-20%	Doubtful negative
4	21-50%	Weak positive
6	51-80%	Positive
8	81-100%	Strong positive
0	Not readable	

The phenotype frequencies for HLA Class I and Class II will vary among different populations (*i.e.*, Caucasians, American Blacks, Orientals, etc.).⁴

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. Potency and Specificity

Test reagents have been precisely characterized by separate sequential serological screenings. Reference panels of frozen lymphocyte samples are used in two separate screenings.

Two thirds of all reagents selected are strong with clearly defined specific HLA reactivity (with 70% Strength Index), allowing no more than 10% false positive and 15% false negative reactions. The remaining one third of the reagents do not meet this criteria, but are investigatively useful when used to support other well-defined antibodies. Multispecific antibodies are used only if no monospecific antibodies are available for a particular specificity. Multispecific antibodies were chosen with the same performance characteristics for all specificities as the monospecific antibodies. Screening against a panel of freshly prepared lymphocytes is used to confirm and validate serum strength and specificity. Analysis is performed using computing techniques of the Eighth International Histocompatibility Workshop in 1980.⁴

B. Negative Control

The negative control antiserum is from a healthy male of blood type AB, which has no cytotoxic reactivity in tests with random lymphocyte donors. This control is used to determine lymphocyte viability.

C. Positive Control

The positive control is a monoclonal antibody and is strongly cytotoxic to human lymphocytes. This control is used to determine complement activity.

D. Anti-B Lymphocyte Control

The anti-B lymphocyte control is a monoclonal antibody and is strongly cytotoxic to B lymphocytes and non-reactive against platelets, monocytes, and red blood cells. This control is used to determine the purity of B lymphocytes.

BIBLIOGRAPHY

1. Terasaki PI, Bernoco F, Park MS, Ozturk G, and Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA A, B, C and D antigens. Am J. Clin Pathol 69: 103-120, 1978.
2. Danilovs J, Terasaki PI, Park MS, Ayoub G. B lymphocyte isolation by thrombin nylon wool. In Histocompatibility Testing. Terasaki PI, Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, CA 287-288, 1980.
3. ASHI Laboratory Manual, 2nd ed. Edited by Zachary, Andrea A. and Teresi, Gary, p. 199, 1990.
4. Terasaki PI, Ed., Histocompatibility Testing. Los Angeles, CA, 1980.
5. Nikaein A, Ed., ASHI Procedure Manual, 3rd Edition, ASHI, Lenexa, KS.

TRADEMARKS AND DISCLAIMERS

™ Insta-Seal, FluoroQuench, Lambda Monoclonal Trays (LMT), and Stain-Fix are trademarks of One Lambda, Inc.

® FluoroBeads and LymphoKwik are registered trademarks of One Lambda, Inc.

EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE

EC REP MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175, Hannover, Germany

EXPLANATION OF SYMBOLS

Symbol	Description
	Catalog number
	In vitro diagnostic medical device
	Consult instructions for use
	Caution, consult accompanying documents
	Biological risks
	Temperature limitation
	CE mark of medical quality

EC REP	Authorized representative in the European Community
---------------	---

REVISION HISTORY

Revision	Date	Revision Description
7	2011/05	Removed Catalog ID's: SMT144 A/B, SMT1A72, SMT1B72, SMT372, SMT72R, SMT96. Updated the One Lambda Logo in header section. Updated the European authorized representative address and Doc ID in footer section. NCR#1439.
8	2014/02	Remove Catalog ID's: SMDR72, SMBL72. Added Trademarks and Explanation of Symbols sections. Modified layout.
9	2016/04	Add 2LM72 and transferred to current PI template.



LAMBDA MONOKLONINIO HLA I IR II KLASĖS AUDINIŲ TIPAVIMO PLOKŠTELĖS



Katalogo Nr. LM144, LM144A, LM144B, 2LM72, LM172, LM272, LM372, LM72OR, LM96, LMB2701, LMB2703, LMBL72, MDR160, MDR172, MDR272



Diagnostikai in vitro.

PASKIRTIS



Skirtos naudoti nustatant HLA I ir II klasės ląstelės paviršiaus antigenus, taikant nuo komplemento priklausomą mikrolimfocitotoksinį metodą.

SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

HLA I ir II klasės Lambda monokloninio tipavimo (LMT™) plokštelėse yra žinomo monokloninio reagento ir triušio komplemento mišinio, kuris yra naudojamas nustatyti HLA I ir II klasės antikūnų buvimą ant T ir B limfocitų. Kiekviename šulinėlyje yra 1 mikrolitras (1 µl) specifinio monokloninio ir komplemento mišinio, o taip pat 5 mikrolitrai (5 µl) beveik nelakaus mineralinio aliejaus. Kiekvienos plokštės sudėtyje yra teigiama ir neigiama kontrolė. II klasės tipavimo plokštelėse taip pat yra anti-B ir anti-T limfocitų monokloninių antikūnų.

PRINCIPAS

Gyvybingi limfocitai yra inkubuojamii su komplementu fiksuotų monokloninių antikūnų ir komplemento mišinyje. Jei limfocitai ekspresuoja antigeną, atpažįstamą pagal specifinį antikūną, Fab antikūno dalis fiksuojasi prie antigeno, sudarydama antigeno-antikūno kompleksą. Po to, kai susiformuoja šie kompleksai, komplemento C1q ir Ca⁺⁺ fiksuojasi prie FC antikūno dalies. Vienas IgM antikūnas turi fiksuoti vieną C1q molekulę arba du IgG antikūnai turi fiksuoti vieną C1q molekulę. C1q fiksavimas pradeda komplementų kaskadą, kuri sukelia ląstelių su antigenų-antikūnų kompleksais lizę. Kai reakcija neigiama, limfocitai išlieka gyvybingi. Kai reakcija teigiama, limfocitai yra žuvē.

REAGENTAI

A. Identifikacija

ŽLA I ir II klasės „Lambda“ monokloninio tipavimo plokštelėse yra anti-I ar II klasės monokloninių antikūnų ir triušio komplemento mišinio. Kiekviename šulinėlyje yra 1 µl specifinio monokloninio ir komplemento mišinio ir 5 µl beveik nelakaus mineralinio aliejaus.

Pastaba: Monokloniniai antikūnai gali būti gaunami iš pelės ar žmogaus organizmo.



B. Pespėjimas arba įspėjimas

1. Diagnostikai in vitro
2. **Įspėjimas:** Visi kraujo produktai turi būti laikomi potencialiai užkrečiamais. Atlikus FDA šiuo metu reikalaujamus atlikti testus pradinei medžiagai, iš kurios buvo gautas šis preparatas, testų rezultatai buvo neigiami. Nėra jokių žinomų testų metodų, visiškai užtikrinančių, kad produktai, paruošti naudojant žmogaus kraują, neperneš užkrečiamų agentų.
3. **Įspėjimas:** Etidžio bromidas yra žinomas karcinogenas. Naudokite taikydami atitinkamas saugos priemones. Gali būti žalingas, jei įsiskverbia į odą. Stenkitės, kad nepatektų į akis ar neužtikštų ant odos ar drabužių. Laikyti sandariai uždarytą. Po naudojimo kruopščiai nuplauti.
4. Išsamią informaciją galite rasti saugos duomenų lape.





- C. Reagentų paruošimas naudoti
1. Žr. „Naudojimo nurodymai“.



- D. Laikymo instrukcijos
- Laikykite reagentus ant pakuotės nurodytoje temperatūroje. Sunaudoti iki atspausdinto galiojimo termino.
- E. Gryninimas arba apdorojimas, reikalingi naudojimui
- Žr. skyrių „Naudojimo nurodymai“.
- F. Nestabilumo požymiai
- Dėl bakterinio užteršimo ir (arba) anglies dioksido poveikio serumai pakeis pH. Šį pH pokytį rodo iš rausvos į geltoną pasikeitusi spalva. Jei įvyksta toks pasikeitimas, išmeskite plokšteles.

REKALAVIMAI DĖL INSTRUMENTŲ

- Netaikoma.

MĖGINIŲ ĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

Kadangi gyvybingi limfocitai yra reikalingi serologiniam tipavimui, gautas kraujas turi būti apdorotas nedelsiant, iškart po gavimo. Limfocitų kiekis mažėja su laiku ir veikiant ekstremalioms temperatūroms. Kraujas turėtų būti paimamas, apdorojant rūgšties citrato dekstrozės tirpalu (ACD) arba natrio heparinu, laikomas horizontalioje padėtyje kambario temperatūroje (20 - 25° C) ir analizuojamas 48 valandų laikotarpiu, siekiant panaudoti didžiausią T ir B limfocitų kiekį.

PROCEDŪRA

A. Pridedamos medžiagos

1. HLA I ir II klasės tipavimo plokštelė (-s), 60 ar 72 šulinėlių
2. Darbo lapai, kuriuose nurodytas kiekvieno monokloninio antikūno specifiškumas.

B. Reikalingos medžiagos, kurių nėra pakuotėje

1. Mikrošvirkštai
2. Insta-Seal™ (OLI Kat. Nr. TIS250U) dengiamieji objektiniai stiklainiai ir petrolatas (Vaseline™)
3. Dažymo ir fiksavimo reagentai:
 - a. **Dažų išskyrimo tirti:** Eozinas Y (natrio pagrindu) ir formaldehidai arba Stain-Fix™ („OLI“ Kat. Nr. SF-500)
 - b. **Fluorescencijai tirti:** FluoroQuench™ AO/EB (OLI Kat. Nr. FQAE-500) ar FluoroQuench™ EB (OLI Kat. Nr. FQEB-500) arba pridėkite 1 ml EB pradinio tirpalo į 9 ml hemoglobino ar 1% dažų (žr. medžiagų Nr. 4 - 7 žemiau).
4. Atšaldytas hemoglobinas
 - a. **Iš liofilizuoto jaučio serumo:**
 - Ištirpinkite 10 gm hemoglobino 100 ml 5% EDTA PBS. Įpilkite 1 ml 1% natrio azido.
 - Centrifuguokite 45 minutes 1000 g. Laikykite supernatantą -20°C temperatūroje.
 - b. **Iš stabilizuotų raudonųjų kraujo kūnelių:**
 - Pradinis tirpalas: supakuotus eritrocitus praplaukite 3 kartus fiziologiniu tirpalu. Paruoškite 70% hematokrito ir sušaldykite ir atšildykite. Centrifuguokite 45 minutes, esant 20000 g. Dializuokite 3 dienas, naudodami fiziologinį tirpalą.
 - Darbinis tirpalas: įpilkite 10ml 5% EDTA PBS. Įpilkite 1 ml 1% natrio azido į 89ml hemoglobino. Laikykite -20° C temperatūroje.
5. 1% dažų darbinis grūndintas skystis
 - a. Ištirpdykite 1 g jaučio serumo albumino (BSA) 10 ml 5% EDTA PBS.
 - b. Į 9,8 ml BSA/5% EDTA/PBS įpilkite:
 - 100 µl 1% natrio azido.
 - 100 µl „Higgins“ juodo kaligrafijos rašalo

6. 5% EDTA (dinatrio) PBS
 - a. Ištirpdykite 5 g EDTA 90 ml PBS.
 - b. pH pakoreguokite iki 7,2 su M NaOH.
 - c. Paruoškite galutinį turį iki 100 ml su PBS.
7. Etidžio bromido (EB) pradinis tirpalas: ištirpinkite 50 mg 1 ml distiliuoto vandens. Pridėkite 49 ml PBS. Pakaitinkite vandens vonelėje esant 56° C temperatūroje 30 minučių. Laikykite -20° C temperatūroje.
8. Karboksifluoresceino diacetatas (CFDA)
 - a. Pradinis tirpalas: ištirpinkite 10 mg CFDA 1 ml acetono stikliniame mėgintuvėlyje. Laikykite -20° C temperatūroje Bekmano mėgintuvėliuose.
 - b. Darbinis tirpalas: naudokite vieną iš šių:
 - Paruoštą PBS esant pH 7,2: pridėkite 30 µl CFDA pradinio tirpalo į 5 ml PBS (pH 7,2). Laikykite 2 - 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.
 - Paruoštą PBS esant pH 5,5: pridėkite 30 µl CFDA pradinio tirpalo į 5 ml PBS (pH 5,5). Laikykite 2 - 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.

C. Naudojimo nurodymai

Pastaba: Informacijos apie limfocitų izoliacijos metodus, ieškokite "ASHI Laboratory Procedure Manual" ("ASHI Laboratorinių tyrimų metodikos vadove")⁵ arba produkto informaciniame lapelyje apie "One Lambda" FluoroBeads® ar LymphoKwik® dėl limfocitų atskyrimo metodų.

A. Testavimas



1. Atšildykite padėklus kambario temperatūroje (20 - 25°C) 15 minučių ir naudokite per 1 valandą po atšildymo.
Dėmesio! Neužšaldykite dar kartą.
 2. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 1 µl 2 x 10⁶ ląstelių/ml arba T ar B limfocitų suspensijos į I klasės plokštelę, arba B limfocitus į II klasės plokštelę. Apie fluorescencinį testavimą naudojant CFDA, žiūrėkite apačioje „B“ dalį.
 3. Sumaišykite mikrolašelius kartu, naudodami elektrosstatinį maišiklį arba laidą.
 4. Inkubuokite plokšteles kambario temperatūroje (20 - 25° C) 1 valandą.
 5. Po inkubavimo nudažykite ir užfiksuokite ląsteles.
 - a. Dažų atskyrimo testui į kiekvieną šulinėlį įpilkite:
 - 5 µl eozino dažų, po 2 minučių 5 µl formaldehido į kiekvieną šulinėlį **arba**
 - 10 µl Stain-Fix™ (OLI Kat. Nr. SF-500).
 - b. Fluorescenciniam testavimui įpilkite 5 µl FluoroQuench™ AO/EB (OLI Kat. Nr. FQAE-500). CFDA testavimui ("B" dalis žemiau), įpilkite 5 µl FluoroQuench™ EB (OLI Kat. Nr. FQEB-500) į kiekvieną šulinėlį arba įpilkite 50 µl etidžio bromido vienam ml šaldyto hemaglobino ar 1% grūdintų dažų. Įpilkite 5 µl į kiekvieną šulinėlį.
 6. Uždenkite plokšteles Terasaki Insta-Seal™ (OLI Kat. Nr. TIS250U). Jeigu vietoj to naudojama stiklo skaidrė, izoliuokite, naudodami ištirpintu petrolatu. Palaikykite plokšteles (20 - 25° C) 15 minučių, kad leistumėte limfocitams nusistovėti. Dažų atskyrimo plokštelės gali būti laikomos 2 - 5° C temperatūroje iki 2 savaičių. Fluorescencinės plokštelės gali būti laikomos 2 - 5° C temperatūroje tamsoje iki 2 dienų. Plokštelės, uždengtos Terasaki Insta-Seal™ dengiamaisiais stiklėliais, turi būti nuskaitytos tą pačią dieną, kai jos paruošiamos testuoti.
- ### B. Fluorescencija: limfocitų paruošimo CFDA žymėjimas
1. Inkubuokite limfocitus 500 µl CFDA pH 7,2 esant 37° C temperatūrai 15 minučių arba CFDA pH 5,5 5 minutes esant 20 - 25° C temperatūrai. Limfocitams, izoliuotiems magnetinėmis granulėmis, inkubuokite 500 µl CFDA pH 5,5 esant 20 - 25° C temperatūrai 10 minučių.
 2. Centrifuguokite 1 minutę 1000 g. Pašalinkite supernatantą. Limfocitus, izoliuotus magnetinėmis granulėmis, uždėkite ant magneto 1 minutę. Pašalinkite supernatantą.
 3. Resuspenduokite į PBS.
 4. Pakartokite dukart 2 ir 3 žingsnius.
 5. Resuspenduokite ląsteles Mak-Kojaus (McCoy's) mėgintuvėliuose su 0,5% FCS, ir pritaikykite ląsteles 2 x 10⁶ ląstelių/ml koncentracijai. Saugokite nuo šviesos.
 6. Vadovaukitės aukščiau pateikto „Testavimo“ skyriaus 2—6 žingsniais.

REZULTATAI

A. Duomenų gavimas

1. Ląstelės gali žūti bet kuriame teste, kur HLA ląstelės paviršiaus antigenas yra atpažįstamas pagal jam prilygstantį anti-HLA antikūną. Kai naudojamas dažų pašalinimas, neigiami (gyvybingi) limfocitai atrodo maži, šviesūs ir lūžtantys (refraktilūs). Teigiami (negyvi) limfocitai atrodo tamsūs ir nerefraktiški su eozino dažais. Reakcijų rezultatai įvertinami pagal žuvusių ląstelių procentą.

B. Duomenų analizė

1. Fluorescenciniam testavimui naudojant karboksifluoresceino diacetatą (CFDA) ar akridino oranžą (AO), neigiami (gyvybingi) limfocitai atrodo žali. Naudojant etidžio bromidą (EB) ar propidiumo jodidą (PI), teigiami (negyvi) limfocitai atrodo raudoni.

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

- Sunkumai izoliuojant ląsteles ir limfocitų užteršimas eritrocitais, juos ruošiant, mielės, monocitai, trombocitai ar granulocitai gali būti klaidingų rezultatų priežastis. Be to, klaidingi rezultatai gali būti gauti, kai ląstelių koncentracijos yra virš ar žemiau leistinų ribų. Bakterinis užteršimas ar monokloninių reagentų pH pokytis gali lemti klaidingas neigiamas reakcijas. Tam tikri HLA antigenai dažnai rodo silpnus specifiskumus. Jie yra vadinami kryžmiškai reaguojančiais antigenais ir yra detalizuojami antigenais ir antikūnais iš kiekvienos plokštelės pagal pridedamą reakcijų modelių informacinį lapą.
- II klasės tipavimo plokštelėse anti-B limfocitų kontrolė turi būti teigiama, kad būtų patvirtinta, kad paruoštos ląstelės yra prisodrintos B limfocitų. Jei ši kontrolė yra žemesnė nei reakcijos rezultatas 6, testas nėra galiojantis.

NUMATOMOS REIKŠMĖS

Mikroskopinis testų įvertinimas

Reakcijų rezultatai įvertinami pagal žuvusių ląstelių procentą. Jei neigiamoje kontrolėje yra žuvusių limfocitų, negyvų ląstelių likusiuose šulinėliuose procentas turi būti atitinkamai pakoreguotas.

ASHI rodmenų standartai yra parodyti šioje lentelėje:

<u>Rezultatas</u>	<u>Žuvusių ląstelių</u>	<u>Interpretavimas</u>
1	0-10%	Neigiamas
2	11-20%	Abejotinas neigiamas
4	21-50%	Silpnas teigiamas
6	51-80%	Teigiamas
8	81-100%	Stiprus teigiamas
0	Nenuskaitoma	

Fenotipų dažnumai HLA I ir II klasei skirsis palyginus skirtingas populiacijas (t.y. baltųjų rasės Amerikos juodaodžių, Rytų Azijos, ir t.t.).

SPECIFINĖS EKSPLOATACINĖS SAVYBĖS

A. Pajėgumas ir specifiskumas

Testo reagentai buvo tiksliai charakterizuoti pagal atskirus nuoseklius serologinius skringus. Standartinės sušaldytų limfocitų mėginių panelės yra naudojami dviejose atskirose patikrose.

Du trečdaliai visų atrinktų reagentų yra stiprūs su aiškiai išreikštu specifiniu HLA reaktyvumu (su 70% stiprumo indeksu), leidžiant ne daugiau nei 10% klaidingų teigiamų ir 15% klaidingų neigiamų reakcijų. Likęs vienas trečdalis reagentų neatitinka šių kriterijų, bet yra naudingi tyrimo atžvilgiu, naudojant pagrįsti kitus aiškiai išreikštus antikūnus. Multispecifiniai antikūnai yra naudojami tik kai nėra monospecifinių antikūnų tam tikram specifiskumui nustatyti. Multispecifiniai antikūnai yra išrenkami tomis pačiomis savybėmis visiems specifiskumams kaip ir monospecifiniai antikūnai. Patikra palyginus su šviežiai paruoštų limfocitų paneliu, yra naudojama patvirtinti ir įteisinti serumo stiprimą ir specifiskumą. Analizė yra atliekama naudojant aštuntojo tarptautinio audinių suderinamumo seminario 1980 m. (Eighth International Histocompatibility Workshop) kompiuterinius metodus.

- B. Neigiama kontrolė**
Neigiamos kontrolės antiserumas yra gautas iš sveiko vyro organizmo, turinčio AB kraujo grupę, kuris neturi citotoksinio reaktyvumo testuose su laisvai parinktais limfocitų donorais. Ši kontrolė yra atliekama nustatyti limfocitų gyvybiškumą.
- C. Teigiama kontrolė**
Teigiama kontrolė yra monokloninis antikūnas ir yra stipriai citotoksiškas žmogaus limfocitams. Ši kontrolė yra atliekama nustatyti komplementų gyvybiškumą.
- D. Anti-B limfocitų kontrolė**
Anti-B limfocitų kontrolė yra monokloninis antikūnas ir yra stipriai citotoksiškas B limfocitams ir nereaguojantis prieš trombocitus, monocitus ir eritrocitus. Ši kontrolė yra naudojama nustatyti B limfocitų grynumą.

BIBLIOGRAFIJA

1. Terasaki PI, Bernoco F, Park MS, Ozturk G, and Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA A, B, C and D antigens. Am J. Clin Pathol 69: 103-120, 1978.
2. Danilovs J, Terasaki PI, Park MS, Ayoub G. B lymphocyte isolation by thrombin nylon wool. In Histocompatibility Testing. Terasaki PI, Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, CA 287-288, 1980.
3. ASHI Laboratory Manual, 2nd ed. Edited by Zachary, Andrea A. and Teresi, Gary, p. 199, 1990.
4. Terasaki PI, Ed., Histocompatibility Testing. Los Angeles, CA, 1980.
5. Nikaein A, Ed., ASHI Procedure Manual, 3rd Edition, ASHI, Lenexa, KS.

PREKĖS ŽENKLAI IR ATSAKOMYBĖS APRIBOJIMAI

™ „Insta-Seal“, „FluoroQuench“, „Lambda Monoclonal Trays (LMT)“ ir „Stain-Fix“ yra „One Lambda, Inc.“ prekės ženklai.

® „FluoroBeads“ ir „LymphoKwik“ yra registruoti „One Lambda, Inc.“ prekės ženklai.

GLIOTASIS ATSTOVAS EUROPOJE

EC REP MDSS GmbH, Schiffgraben 41, D-30175, Hanoveris, Vokietija

SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAS

Simbolis	Reikšmė
	Katalogo numeris
	In vitro diagnostinis medicininis prietaisas
	Žr. naudojimo instrukcijas
	Dėmesio! Žr. pridėtus dokumentus
	Biologinis pavojus
	Temperatūros ribos
	Medicininės kokybės CE ženklas
	Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje

PADARYTI PATAISYMAI

Pataisymas	Data	Pataisymo paaiškinimas
6C	2005/09	Katalogo Nr.: LM372, LM72OR, LMBL72.
7	2011/05	Pašalinkite katalogo identifikatorius: SMT144 A/B, SMT1A72, SMT1B72, SMT372, SMT72R, SMT96. Atnaujintas "One Lambda" logotipas viršutinėse puslapių antraštėse. Atnaujintas įgaliotojo atstovo Europoje adresas ir dokumento identifikatorius apatinėje antraštėje.
8	2014/02	Pašalinti katalogo ID: SMDR72, SMBL72. Pridėti prekės ženklų ir simbolių paaiškinimų skyriai. Koreguotas išdėstymas.
9	2016/04	Pridėta 2LM72 ir perkelta į šiuolaikinį PI šabloną.





ONE LAMBDA, INC.

21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904

www.onelambda.com

PRODUCT INSERT

REF FLUROBEADS®-B AND PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)/CITRATE REAGENT
Catalog # FB2-25, FB2-100, PC1-500

IVD For In Vitro Diagnostic Use.

INTENDED USE



FluroBeads®-B provide a simple procedure for the isolation of B lymphocytes for use in HLA Class II typing assays using fluorescent dyes. PBS/Citrate is a reagent for use in the FluroBeads®-B isolation method.

SUMMARY AND EXPLANATION

FluroBeads®-B are immunomagnetic beads that are less than 1 micron in diameter. Anti-CD19 monoclonal antibodies are coupled to the bead surface. CD19 antibodies specifically bind to B lymphocytes. FluroBeads®-B offer the user a quick method of separating B lymphocytes from blood with the use of a collector magnet. The FluroBeads®-B method requires no cold incubations, rotations, or centrifugations. PBS/Citrate enhances the performance of the beads.

PRINCIPLE(S)

Immunomagnetic beads are superparamagnetic particles with monoclonal antibodies coupled to their surface. The beads can be collected using a magnetic field. When the magnetic field is removed, the beads do not retain any residual magnetism. They can be repeatedly magnetized and redispersed. The specificity of the coupled monoclonal antibody determines the type of cell collected.

REAGENTS

A. Identification

FluroBeads®-B are superparamagnetic particles coupled to anti-CD19 monoclonal antibody and suspended in BSA/PBS with NaN₃ as a preservative. The monoclonal antibody is of murine origin. The PBS/Citrate reagent contains citric acid, Na₃ citrate, PBS, and other proprietary ingredients.

avoid deposits in plumbing where explosive conditions may develop.

- CAUTION:** Do not use lithium heparin as an anticoagulant for your blood sample.
- Refer to the Material Safety Data Sheet for detailed information.

B. Warning or Caution



- WARNING:** All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test method can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents.
- WARNING:** This reagent contains 0.01% sodium azide, which under acidic conditions yields hydrazonic acid, an extremely toxic compound. Reagents containing sodium azide should be diluted in running water prior to being discarded. These conditions are recommended to



C. Instructions for Use

See DIRECTIONS FOR USE on page 3.

D. Storage Instructions

Store reagents at temperature indicated on package. Use before printed expiration date.

E. Purification or Treatment Required for Use

Resuspend FluroBeads®-B thoroughly before use by vortexing approximately 10 seconds.

F. Instability Indications

Do not use if the beads are clumped. Severe clumping of beads may indicate deterioration of the product.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Approximately 10 ml of whole blood should be drawn. The preferred anticoagulant is ACD or CPDA. **Do not use lithium heparin!** B cells should be isolated within 24 hours to achieve the highest yield. However, blood up to 3-days-old can be used. Store blood specimen horizontally at room temperature (20 to 25° C) until beginning the isolation procedure.

PROCEDURE

A. Materials Provided

- FluroBeads®-B
- Instructions for cell isolation and testing

Materials Required, But Not Provided

- Class II tissue typing trays (One Lambda or equivalent)

One Lambda | Product Insert: FLUOROBeads®-B AND PHOSPHATE BUFFERED SALINE (pbs)/CITRATE REAGENT

2. 5 ml and 1.5 ml plastic or glass centrifuge tubes with caps
 3. Phosphate Buffered Saline (PBS) **without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ salts** (i.e., Irvine Scientific Cat. #9249)
 4. McCoy's medium or equivalent **with 5% HIFCS**
 5. Magnetic Separator (One Lambda or equivalent)
 6. Aspirator or disposable pipettes
 7. PBS/Citrate Reagent
 - a. OLI Cat. #PC1-500
 - b. PBS/Citrate Reagent
 - 1) Stock Solution (10X Citrate): Dissolve 7 gm Trisodium Citrate Dihydrate and 2.5 gm Citric Acid in 90 ml distilled water. Bring final volume to 100 ml. Filter, sterilize, and store at 2° to 5° C.
 - 2) Working Solution (1X PBS/Citrate): Add 10 ml of 10X Citrate to 90 ml of PBS. Filter, sterilize, and store at 2° to 5° C.
 - 8) Heat-Inactivated Fetal Calf Serum (HIFCS)
 - a. Stock solution: Heat FCS at 56° C for 30 minutes to inactivate complement. Store at 2° to 5° C or aliquot and freeze at -20° C.
 - b. Working solution: Add 5 ml HIFCS stock solution to 95 ml of McCoy's medium or equivalent.
- B. Optional Materials, Not Provided**
1. Ficoll-Hypaque
 2. Percoll
 - a. Stock solution (Percoll-X): Combine 1 part of 10X PBS and 9 parts of Percoll [Density (D) = 1.077].
 - b. Working solution (50% Percoll): Combine equal parts of Percoll-X and PBS.
 3. Stain/Quench Reagents
 - a. Acridine Orange/Ethidium Bromide FluoroQuench™ (OLI Cat. #FQAE500), or
 - b. Ethidium Bromide FluoroQuench™ (OLI Cat. #FQEB500), or
 - c. Add 1 ml EB stock solution to 9 ml hemoglobin or 1% ink (See Materials #12-16)

CAUTION: Sodium Azide is toxic. Always wear protective equipment when handling Sodium Azide.

4. Hemoglobin: Dissolve 10 gm lyophilized hemoglobin in 90 ml 5% EDTA/PBS. Bring volume to 99 ml. Add 1 ml of 1% Sodium Azide. Centrifuge at 1000 g for 45 minutes. Store supernatant at -20° C.
5. Ink: Dissolve 1 gm bovine serum albumin (BSA) in 10 ml 5% EDTA/PBS. Add 0.1 ml 1% Sodium Azide and 0.1 ml Higgins Black Calligraphy Ink.
6. 1% Sodium Azide: Dissolve 1 gm sodium azide in 100 ml PBS.
7. 5% Disodium Ethylenediamine-Tetraacetic Acid (EDTA)/PBS: Add 5 gm EDTA to 90 ml PBS. Adjust pH to 7.2 with 10 M NaOH to dissolve EDTA. Bring volume to 100 ml with PBS.
8. Ethidium Bromide (stock solution): Dissolve 50 mg in 1 ml distilled water. Add 49 ml PBS. Heat in water bath to 56° C for 30 minutes. Aliquot and freeze at -20° C.
9. Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA)
 - a. Stock CFDA solution: In a glass tube, dissolve 10 mg CFDA in 1 ml acetone. Store at -20° C. Store in the dark.
 - b. Working solution. Use either of the following:
 - Prepared in PBS at pH 7.2: Add 30 µl stock CFDA solution to 5 ml PBS (pH 7.2). Store at 2 to 5° C for up to one week.
 - Prepared in PBS at pH 5.5: Add 30 µl stock CFDA solution to 5 ml PBS (pH 5.5). Store at 2 to 5° C for up to one week.

Step-by-step procedure.

See DIRECTIONS FOR USE below.

DIRECTIONS FOR USE

ISOLATION TECHNIQUES

A. Isolation from Buffy Coat

1. Centrifuge whole blood at 400 to 900 g for 10 minutes.
2. Transfer approximately 1 ml of buffy coat to a 5 ml tube.
3. Add 4 ml PBS/Citrate.
4. Resuspend FluoroBeads®-B thoroughly before use. Vortex approximately 10 seconds.
5. Add 100 µl FluoroBeads®-B to blood sample. Immediately cap tube and invert 2 to 3 times to disperse magnetic beads.
6. Rotate tube once per second for **3 minutes** at 20° to 25° C to allow the beads to bind B cells. Do not exceed 4 minutes. Use an end-over-end rotating device or hand mix.
7. Uncap and place tube in magnetic separator for 2 minutes. Do not exceed 3 minutes.
8. Remove and discard supernatant with a disposable pipette. Remove tube from magnet.
9. Resuspend cells (beads) with 1 to 2 ml PBS/citrate. Gently flick tube to disperse beads. Replace tube in magnetic separator for 1 minute. Remove and discard supernatant. Repeat twice using PBS only.
10. Proceed to the "Labeling and cell Concentrations Procedures" (below), or resuspend cells (beads)

One Lambda | Product Insert: FLUOROBeads®-B AND PHOSPHATE BUFFERED SALINE (pbs)/CITRATE REAGENT

in 0.5 ml of McCoy's medium or equivalent medium with 5% HIFCS.

B. Isolation from Ficoll Interface

1. Centrifuge citrated or heparinized blood for 10 minutes at 400 to 900 g.
2. Collect buffy coat and dilute with an equal volume of PBS. Mix well.
3. Layer a maximum of 2 ml buffy coat/PBS mixture over 1.5 ml of Ficoll-Hypaque [Density (D) = 1.077] in 5 ml tubes and centrifuge for 10 minutes at 1,000 g.
4. Collect approximately 1 ml of interface from each tube and transfer into centrifuge tubes. Centrifuge for 1.5 minutes at 3,000 g or 10 minutes at 1,000 g.
5. Discard the supernatant and resuspend pellet in PBS. Centrifuge for 5 minutes at 1000 g (removes the majority of platelets).
6. Discard supernatant with disposable pipette. Resuspend pellet in 1 ml of 20% HIFCS/PBS.
7. Dispense 100 µl FluoroBeads®-B to sample tube and cap the tube.
8. Rotate sample once per second for 3 minutes at 20° to 25° C.
9. Uncap and place tube in magnetic separator for 1 minute.
10. Remove and save supernatant in another tube for T lymphocyte isolation with FluoroBeads®-T.
11. Resuspend beads/cells in 1 ml 20% HIFCS/PBS. Gently flick tube to resuspend beads. Place in magnetic separator for 30 seconds. Discard supernatant with a disposable pipette. Repeat two times.
12. Proceed to "Labeling and Cell Concentration Procedures" below or resuspend cells (beads) in 0.5 ml McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.

C. Isolation from Frozen Ficoll Interface

1. Thaw whole cells at 56° C (DMSO removal is not required).
2. Layer 0.5 ml of cell suspension over 0.5 ml 50% Percoll in a 1.5 ml centrifuge tube.
3. Centrifuge at 2000 g for 2 minutes or a 400 g for 10 minutes
4. Discard supernatant with disposable pipette.
5. Resuspend cells in 1 ml 20% HIFCS/PBS.
6. Dispense 100 µl FluoroBeads®-B into sample tube and cap tube.
7. Rotate sample once per second for 3 minutes at 20° to 25° C.
8. Uncap and place tube in magnetic separator for 1 minutes.
9. Transfer supernatant to another centrifuge tube for T lymphocyte isolation with FluoroBeads®-T.
10. Resuspend remaining beads/cells in 1 ml 20% HIFCS/PBS. Gently flick tube to resuspend beads and place on magnetic separator for 30

seconds. Discard supernatant using disposable pipette. Repeat twice.

11. Proceed to the "Labeling and cell Concentration Procedures" below, or resuspend cells (beads) in 0.5 ml McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.

12.

D. Isolation from Whole Blood

1. Transfer 5 ml whole blood to a 15 ml tube.
2. Add 5 ml 1X PBS/Citrate and mix by inversion.
3. Dispense 100 µl FluoroBeads®-B into the sample and rotate once per second for 5 minutes do not rotate more than 5 minutes) with either an end-over-end rotator or by hand at 20° to 25° C.
4. Uncap and place tube in magnet for 5 minutes. Remove and discard supernatant. Remove tube from magnet.
5. Add 2 to 3 ml of 1X PBS/Citrate to sample. Gently flick to resuspend beads. Place tube in magnet for 1 minute. Repeat twice using PBS only.
6. Proceed to "Labeling and Cell Concentration Procedures" below, or resuspend cells (beads) in 0.5 ml McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.

LABELING AND CELL CONCENTRATION PROCEDURES

A. CFDA Method

1. Uncap and place tube in magnetic separator for 1 minute. Remove supernatant. Resuspend cells (beads) with PBS. Repeat twice.
2. Add 0.5 ml of CFDA (working solution, pH 5.5) and mix.
3. Incubate tube horizontally in the dark for 10 minutes at 20° to 25° C.
4. Repeat Step 1 above.
5. Resuspend cells in 0.5 ml McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.
6. Add 1 µl cell suspension to a blank well of a Terasaki tray. Check cell count with a fluorescent microscope. Adjust the concentration to 2×10^6 /ml (2,000 cells per well).
7. Samples can be transferred to 1.5 ml tubes and stored horizontally at 2° to 5° C up to 2 days before testing.

B. FQAE Method

1. Add 1 µl cells (beads) to a blank well of a Terasaki tray.
2. Add 5 µl FQAE (OLI Cat. #FQAE-500) to well.
3. Check cell count with a fluorescent microscope. Adjust cell concentration to 2×10^6 /ml (2000 cells per well).
4. Samples can be transferred to 1.5 ml tubes and stored horizontally at 2° to 5° C up to 2 days before testing.

DR TYPING PROCEDURES

One Lambda | Product Insert: FLUOROBeads®-B AND PHOSPHATE BUFFERED SALINE (pbs)/CITRATE REAGENT

Note: The following are recommended protocols. Incubation times may vary depending on the strength of typing reagents and/or complement used. (Thirty minutes with antibody and sixty minutes with complement is suggested for One Lambda tissue typing reagents.

A. CFDA Method

1. Mix cell preparation by tapping pellet and inverting tube. Do not mix with a syringe. Add 1 µl CFDA labeled cells (beads) to each well of an HLA Class II typing tray.
2. Incubate in the dark for 30 minutes at 20° to 25° C. **(For monoclonal DR trays, incubate for 60 minutes at 20° to 25° C and proceed to Step 5 below.)**
3. Add 5 µl rabbit complement to each well.
4. Incubate the tray in the dark for 1 hour at 20° to 25° C.
5. To each well, add 5 µl of **one** of the following ingredients.

- a. FluoroQuench™ Ehtidium Bromide (OLI Cat. #FQEB500), or
 - b. EB/hemoglobin working solution, or
 - c. EB/1% ink working solution.
6. Trays can be read immediately, or may be stored in the dark at 20° to 25° C for up to 2 days.

B. FQAE Method

1. Mix cell preparation by tapping pellet and inverting tube. Do not mix with a syringe. Add 1 µ cells (beads) to each well of an HLA Class II typing tray.
2. Incubate for 30 minutes at 20° to 25° C. (For monoclonal DR trays, incubate for y60 minutes at 20° to 25° C and proceed to Step 5 below.
3. Add 5 µl DR complement to each well.
4. Incubate 1 hour in the dark at 20° to 25° C.
5. To each well, add 5 µl of FQAE.
6. Trays can be read immediately, or may be stored in the dark at 20° to 25° C for up to 2 days.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The cell yield will vary with each specimen, depending on the cell count and the time since blood collection. Various diseases can cause a decrease in the lymphocyte yield. Some medications can cause a decrease in the lymphocyte yields, as well, and may cause a decrease in HLA antigen expression. Cadaveric samples may have low lymphocyte yields with elevated monocyte and granulocyte contamination.

Contamination with other cells can cause weak/false negative reactions. Monocytes have a variable amount of HLA Class I and Class II antigens. Platelets have HLA Class I antigens and can weaken antisera by absorbing the antibodies from the antisera.

EXPECTED VALUES

FluoroBeads®-B contain enough immunomagnetic beads to isolate more than 90% of the CD19⁺ B cells in a buffy coat from 10 ml of whole blood.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The purity of the lymphocytes isolated should be over 90%. Cells should be reactive with anti-HLA sera and should be lysed under standard lymphocytotoxicity assay conditions.

EC REP EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, D-30175, Hannover, Germany

TRADEMARKS AND DISCLAIMERS

® FluoroBeads is a registered trademark of One Lambda, Inc.

One Lambda | Product Insert: FLUOROBeads®-B AND PHOSPHATE BUFFERED SALINE (pbs)/CITRATE REAGENT

REVISION HISTORY

Revision	Date	Revision Description
10	2011/09	Removed Cat ID FB2-40.
11	2013/11	Removed designation (For General Laboratory Use); Replaced with (IVD) symbol and designation (For In Vitro Diagnostic Use). Added second page header. Added a Trademark and Disclaimer Section. Modified heading to match those underlined. Modified bulleted lists to double columns.





ONE LAMBDA, INC.

21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 USA Tel: +1 (818) 702-0042 Fax: +1 (818) 702-6904 www.onelambda.com

PRODUKTO INFORMACINIS LAPELIS

REF

FLUROBEADS®-B AND PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)/CITRATE REAGENT (FLUROBEADS®-B IR FOSFATINIO BUFERIO DRUSKOS TIRPALO (PBS)/CITRATO REAGENTAS)

Katalogų Nr. FB2-25, FB2-100 ir PC1-500

Naudoti bendram laboratoriniam darbui.



SKIRTAS NAUDOTI

FluroBeads®-B pateikia paprastą procedūrą atskirti B limfocitus naudoti ŽLA II klasės tipavimo tyrimuose, naudojant fluorescencinius dažus. PBS/citratas yra reagentas, naudojamas taikant FluroBeads®-B izoliacijos metod¹.

SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

FluroBeads®-B yra imunomagnetinės granulės, kurios yra mažesnės nei 1 mikrono skersmens. Anti-CD19 monokloniniai antikūnai yra prie granulės paviršiaus. CD19 antikūnai konkrečiai jungiasi prie B limfocitų. FluroBeads®-B siūlo greitą metodą atskirti B limfocitus iš kraujo, naudojant surenkantįjį magnetą. FluroBeads®-B metodas nereikalauja šaltų inkubavimų, sukimų ar centrifugavimų. PBS/citratas pagerina granulių savybes.

PRINCIPAS

Imunomagnetinės granulės yra superparamagnetinės dalelės su monokloniniais antikūnais, susiporavusiais prie jų paviršiaus. Granulės gali būti surenkamos naudojant magnetinį lauką. Kai magnetinis laukas yra pašalinamas, granulės neišlaiko jokio liekamojo magnetizmo. Jos gali būti pakartotinai magnetizuotos ir pakartotinai išsklaidytos. Suporuoto monokloninio antikūno specifiškumas lemia renkamų ląstelių tipą.

REAGENTAI

A. Identifikacija

FluroBeads®-B superparamagnetinės dalelės suporuotos su anti-CD19 monokloniniais antikūnais ir suspenduotos BSA/PBS su konservantu naudojamu NaN₃. Monokloniniai antikūnai yra pelių kilmės. The PBS/citrato reagento sudėtyje yra citrinos rūgšties, PBS ir kitų patentuotų sudedamųjų dalių.

B. Perspėjimas arba atsargos priemonės

1. Naudoti bendram laboratoriniam darbui.
2. **ISPĖJIMAS:** Visi kraujo produktai turi būti laikomi potencialiai užkrečiamais. Atlikus FDA (JAV Maisto ir vaistų administracijos) dabartiniu metu reikalaujamus atlikti testus dėl pirminės medžiagos, iš kurios buvo gautas šis produktas, rezultatai buvo neigiami. Nėra jokių žinomų testų metodų, visiškai užtikrinančių, kad produktai, paruošti naudojant žmogaus kraują, nepereš užkrečiamų agentų.
3. **ISPĖJIMAS:** Šiame reagente yra 0,01% natrio azido, kuris esant rūgštinėmis sąlygomis išskiria hidrazoninę rūgštį, ypač nuodingą junginį. Reagentai, kurių sudėtyje yra natrio azido, turi būti atskiesti tekančiu vandeniu, prieš juos pašalinant kaip nebetinkamus. Šios priemonės yra rekomenduojamos, siekiant išvengti nuosėdų nutekamuosiuose vamzdžiuose, kur gali susidaryti sprogimą sukeliančios sąlygos.
4. **ATSARGIAI:** Nenaudokite ličio heparino kaip koagulianto jūsų kraujo mėginiui.
5. Išsamesnės informacijos ieškokite Medžiagų saugos duomenų lape

C. Naudojimo taisyklės

Žr. „NAUDOJIMO TAISYKLES“ 3 psl.

D. Laikymo taisyklės

Laikykite reagentus ant pakuotės nurodytoje temperatūroje. Naudokite prieš pasibaigiant atspausdintam galiojimo terminui.

E. Gryninimas ar apdorojimas reikalingas paruošiant naudoti

Kruopščiai resuspenduokite FluroBeads®-B prieš intensyvų maišymą maždaug 10 sekundžių.

F. Nestabilumo indikacijos

Nenaudokite, jei granulės yra supuolusios gabalais. Itin supuolusios granulės gali rodyti produkto gedimą.

MĖGINIŲ ĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

Turi būti paimta 10 ml gryno kraujo. Pageidautina naudoti koaguliantą ACD ar CPDA. **Nenaudokite ličio heparino!** B laštelės turėtų būti atskirtos per 24 valandas, kad būtų gautas didžiausias jų kiekis. Tačiau kraujas gali būti naudojamas iki 3 dienų senumo. Laikykite kraujo mėginį horizontalioje padėtyje kambario temperatūroje (20 iki 25°C), kol bus pradėta izoliavimo procedūra.

PROCEDŪRA

A. Pridedamos medžiagos

1. FluoroBeads®-B
2. Nurodymai dėl lašelių izoliavimo ir testavimo

Reikalingos medžiagos, kurių nėra pakuotės sudėtyje

1. II klasės audinio tipavimo plokštelės ("One Lambda" ar tolygios)
2. 5 ml ir 1,5 ml plastikiniai ar stiklo centrifugavimo mėgintuvėliai su dangteliais.
3. Fosfatinio buferio druskos tirpalo (PBS) be Ca^{++} ir Mg^{++} druskų (t.y., "Irvine Scientific" Kat. #9242)
4. Mak-Kojaus (McCoy's) terpė ar jai lygiavertė su 5% HIFCS
5. Magnetinis separatorius ("One Lambda" ar lygiavertis)
6. Aspiratorius ar vienkartinės pipetės
7. PBS/citrato reagentas
 - a) OLI Kat. Nr. PC1-500, ARBA
 - b) PBS/citrato reagentas
 - (1) Pradinis tirpalas (10X Citrato): Ištirpdykite 7 gm trinatricio citrato ir 2,5 gm citrinos rūgšties 90 ml distiliuoto vandens. Papildykite iki galutinio tūrio 100 ml. Sterilizuokite filtruodami ir laikykite 2 iki 5°C temperatūroje.
 - (2) Darbinis tirpalas (1X PBS/citrato): Įpilkite 10 ml 10X citrato į PBS 90 ml. Sterilizuokite filtruodami ir laikykite 2 iki 5°C temperatūroje.
8. Karščio inaktyvuotas fetalinis veršelių serumas (HIFCS)
 - a) Pradinis tirpalas: Pakaitinkite FCS 56°C temperatūroje 30 minučių, kad inaktyvuotumėte komplementą. Laikykite 2 iki 5°C temperatūroje ar padalinkite į alikvotas ir sušaldykite -20°C temperatūroje.
 - b) Darbinis tirpalas: Įpilkite 5 ml HIFCS pradinio tirpalo į 95 ml mak-Kojaus (McCoy's) terpę ar jai lygiavertę.

B. Pasirenkamos medžiagos, neįtrauktos į paketo sudėtį

1. Ficoll-Hypaque
 2. Percoll (Percoll)
 - a) Pradinis tirpalas (Percoll-X): Sumaišykite 1 dalį 10X PBS ir 9 dalis Percoll'io (tankumas (D) = 1,077).
 - b) Darbinis tirpalas (50% Percoll'io): Sumaišykite lygias dalis Percoll-X ir PBS.
 3. Dažymo/gesinimo reagentai
 - a) Akridino oranžo/etidžio bromido FluoroQuench™ (OLI Kat. Nr. FQAE500), ar
 - b) Etidžio bromido FluoroQuench™ (OLI Kat. Nr. FQEB500), ar
 - c) Įpilkite 1 ml EB pradinio tirpalo į 9 ml hemoglobino ar 1% rašalo (žr. medžiagas Nr. 12-16).
- ATSARGIAI:** Natrio azidas yra nuodingas. Visada dėvėkite apsaugines priemones, kai dirbate naudodami natrio azidą.
4. Hemoglobinas: Ištirpinkite 10 gm liofilizuoto hemoglobino į 90 ml 5% EDTA/PBS. Papildykite tūrį iki 99 ml. Įpilkite 1 ml 1% natrio azido. Centrifuguokite 1000 g 45 minutes. Laikykite supernatantą -20° C temperatūroje.
 5. Dažai: Ištirpdykite 1 gm jaučio serumo albumino (BSA) 10 ml 5% EDTA/PBS. Įpilkite 0,1 ml 1% natrio azido ir 0,1 ml "Higgins" juodojo kaligrafijos rašalo.
 6. 1% natrio azido: Ištirpdykite 1 gm natrio azido į 100 ml PBS.
 7. 5% Etilendiamintetraacetato rūgštis (EDTA)/PBS: Įpilkite 5 gm EDTA į 90 ml PBS. Priderinkite pH iki 7,2 su M NaOH iš tirpdyti EDTA. Papildykite galutinį tūrį iki 100 ml su PBS.
 8. Etidžio bromido (pradinis tirpalas): Iš tirpdykite 50 mg 1 ml distiliuoto vandens. Pridėkite 49 ml PBS. Pakaitinkite vonelėje su vandeniu 56°C temperatūroje 30 min. Padalinkite į alikvotas ir sušaldykite -20°C temperatūroje.
 9. Karboksifluoresceino diacetatas (CFDA):
 - a) Pradinis CFDA tirpalas: Stikliniame mėgintuvėlyje ištirpdykite 10 mg CFDA į 1 ml acetono. Laikyti -20° C temperatūroje. Laikyti tamsioje.
 - b) Darbinis tirpalas: Naudokite vieną iš šių:
 - Paruoštą PBS esant pH 7,2: Įpilkite 30 µl pradinio CFDA tirpalo į 5 ml PBS (pH 7,2). Laikykite 2 iki 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.
 - Paruoštą PBS esant pH 5,5: Įpilkite 30 µl pradinio CFDA tirpalo į 5 ml PBS (pH 5,5). Laikykite 2 iki 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.

C. Etapinė procedūra.

Žr. žemiau „Nurodymus kaip naudoti“.

NURODYMAI KAIP NAUDOTI

IZOLIAVIMO METODAI:

A. Atskyrimas nuo leukocitų plėvelės

1. Centrifuguokite pilno kraujo 400 – 900 g 10 minučių.
2. Perdėkite maždaug 1 ml leukocitų plėvelės į 5ml mėgintuvėlį.
3. Įpilkite 4 ml PBS/citrato.
4. Prieš naudodami kruopščiai resuspenduokite FluoroBeads®-B. Pakratykite maždaug 10 sekundžių.
5. Įpilkite 100 µl FluoroBeads®-B į kraujo mėginį. Nedelsiant uždenkite dangteliu ir invertuokite 2-3 kartus, kad išsklaidytumėte magnetines granules.
6. Sukite mėgintuvėlį kartą per sekundę **3 minutes** 20 iki 25°C temperatūroje, kad leistumėte granulėms susijungti su B ląstelėmis. Neviršykite 4 minučių. Naudokite iš rotacinį prietaisą („galas pervirš galą“) arba maišykite pasukdami ranka.
7. Atidenkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių **2 minutes**. Neviršykite 3 minučių.
8. Išimkite ir nusiurbkite supernatantą, naudodami vienkartinę pipetę. Nuimkite mėgintuvėlį nuo magneto.
9. Resuspenduokite ląsteles (granules) su 1 iki 2 ml PBS/citrato. Lengvai stuktelkite į mėgintuvėlį, kad išskirstytumėte granules. Įdėkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę. Išimkite ir pašalinkite supernatantą. Pakartokite dukart, naudodami tik PBS.
10. Pereikite prie „Etikečių žymėjimo ir ląstelių koncentracijų procedūrų“ (žemiau) arba resuspenduokite ląsteles (granules) 0,5 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.

B. Izoliavimas iš Fikolio terpės sąveikos

1. Centrifuguokite citruotą ar heparinizuotą kraują 10 minučių 400-900 g.
2. Surinkite leukocitų plėvelę ir atskieskite tolygiu PBS kiekiu. Gerai išmaišykite.
3. Uždėkite ne daugiau kaip 2 ml leukocitų plėvelės/PBS mišinio sluoksnį virš 1,5 ml. Ficoll-Hypaque (Tankis (D) = 1,077) į 5 ml mėgintuvėlius ir centrifuguokite 10 minučių 1000 g.
4. Surinkite maždaug 1 ml sąlyčio paviršiaus iš kiekvieno mėgintuvėlio ir perdėkite į centrifuginius mėgintuvėlius. Centrifuguokite 1,5 minutės 3000 g. arba 10 minučių 1000 g.
5. Pašalinkite supernatantą ir resuspenduokite granulę PBS. Centrifuguokite 5 minutes 1000 g (pašalinti daugumą granuliu).
6. Naudodami vienkartinę pipetę, pašalinkite supernatantą. Resuspenduokite granulę 1 ml 20% HIFCS/PBS.
7. Įpilkite 100 µl FluoroBeads®-B į mėgintuvėlį ir uždenkite dangteliu.
8. Sukite mėginį kartą per sekundę 3 minutes 20 iki 25°C temperatūroje.
9. Atidenkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę.
10. Išimkite ir išsaugokite supernatantą kitame mėgintuvėlyje T limfocitų atskyrimui, naudojant FluoroBeads®-T.
11. Resuspenduokite granules/ląsteles 1 ml 20% HIFCS/PBS. Lengvai stuktelkite į mėgintuvėlį, kad resuspenduotumėte granules. Patalpinkite magnetiniame separatoriuje 30 sekundžių. Naudodami vienkartinę pipetę, pašalinkite supernatantą. Pakartokite du kartus.
12. Pereikite prie „Etikečių žymėjimo ir ląstelių koncentracijų procedūrų“ (žemiau) arba resuspenduokite ląsteles (granules) 0,5 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.

C. Izoliavimas iš Fikolio terpės sąveikos

1. Atšildykite pilnas ląsteles 56°C temperatūroje (DMSO (dimetilsulfoksid) pašalinimas nereikalaujamas).
2. Uždėkite 0,5ml sluoksnį ląstelių suspensijos virš 0,5 ml 50% Percoll'io 1,5 ml centrifuginiame mėgintuvėlyje.
3. Centrifuguokite 2.000 g 2 minutes ar 400 g 10 minučių.
4. Naudodami vienkartinę pipetę, pašalinkite supernatantą.
5. Resuspenduokite ląsteles 1 ml 20% HIFCS/PBS.
6. Įpilkite 100 µl FluoroBeads®-B į mėgintuvėlį ir uždenkite dangteliu.
7. Sukite mėginį kartą per sekundę 3 minutes 20 iki 25°C temperatūroje.
8. Nuimkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę.
9. Perdėkite supernatantą į kitą centrifuginį mėgintuvėlį T limfocitų atskyrimui, naudojant FluoroBeads®-T.
10. Resuspenduokite likusias granules/ląsteles 1 ml 20% HIFCS/PBS. Lengvai pakratykite mėgintuvėlį, kad resuspenduotumėte granules ir uždėkite ant magnetinio separatoriaus 30 sekundžių. Naudodami vienkartinę pipetę pašalinkite supernatantą. Pakartokite dukart.
11. Pereikite prie „Etikečių žymėjimo ir ląstelių koncentracijų procedūrų“ (žemiau) arba resuspenduokite ląsteles (granules) 0,5 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.

D. Išskyrimas iš pilno kraujo

1. Perpilkite 5 ml pilno kraujo į 15 ml mėgintuvėlį.
2. Pridėkite 5 ml 1X PBS/citrato ir sumaišykite, taikydami inversiją.

3. Įpilkite 100 µl FluoroBeads®-B į mėginį ir sukite kartą per sekundę 5 minutes (nesukite daugiau nei 5 minutes), naudodami arba rotatorių, veikiantį "galas pervirš galo" principu arba pakratydami ranka 20 iki 25°C temperatūroje.
4. Nuimkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetą 5 minutes. Išimkite ir pašalinkite supernatantą. Nuimkite mėgintuvėlį nuo magneto.
5. Įpilkite į mėgintuvėlį 2 iki 3 ml 1X PBS/citrato. Lengvai stuktelkite, kad resuspenduotumėte granules. Įdėkite mėgintuvėlį į magnetą 1 minutę. Pakartokite dukart, naudodami tik PBS.
6. Pereikite prie "Etikečių žymėjimo ir ląstelių koncentracijų procedūrų" (žemiau) arba resuspenduokite ląsteles (granules) 0,5 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.

ŽYMĖJIMO IR LAŠTELIŲ KONCENTRAVIMO PROCEDŪROS

A. CFDA metodas

1. Nuimkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę. Pašalinkite supernatantą. Resuspenduokite ląsteles (granules) su PBS. Pakartokite dukart.
2. Įpilkite 0,5 ml CFDA (darbinio tirpalo, pH5,5) ir sumaišykite.
3. Inkubuokite mėgintuvėlį horizontalioje padėtyje tamsoje 10 minučių 20 iki 25°C temperatūroje.
4. Pakartokite žingsnį Nr. 1.
5. Resuspenduokite ląsteles 0,5 ml mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.
6. Įpilkite 1 µl ląstelių suspensijos į tuščią Terasaki plokštelės šulinėlį. Fluorescentiniu mikroskopu patikrinkite ląstelių skaičių. Priderinkite koncentraciją 2×10^6 /ml (2000 ląstelėms viename šulinėlyje).
7. Mėginiai gali būti perkelti į 1,5 ml mėgintuvėlius ir laikomi horizontalioje padėtyje 2 iki 5°C temperatūroje ne ilgiau nei 2 dienas iki testavimo.

B. FQAE metodas

1. Įpilkite 1 µl ląstelių (granulių) suspensijos į tuščią Terasaki plokštelės šulinėlį.
2. Įpilkite 5 µl FQAE (OLI Kat. Nr. FQAE-500) į šulinėlį.
3. Fluorescentiniu mikroskopu patikrinkite ląstelių skaičių. Priderinkite koncentraciją prie 2×10^6 ląstelių/ml (2000 ląstelių viename šulinėlyje).
4. Mėginiai gali būti perkelti į 1,5 ml mėgintuvėlius ir laikomi horizontalioje padėtyje 2 iki 5°C temperatūroje ne ilgiau nei 2 dienas iki testavimo.

DR TIPAVIMO PROCEDŪROS

Pastaba: žemiau pateikiami rekomenduojami protokolai. Inkubavimo trukmė gali įvairuoti, priklausomai nuo tipavimo reagentų stiprumo ir (ar) naudoto komplemento. "One Lambda" audinio tipavimo reagentams siūloma trisdešimt minučių su antikūnais ir šešiasdešimt minučių su komplementu.

A. CFDA metodas

1. Maišykite ląstelių ruošinį kratydami granules ir invertuodami mėgintuvėlį. Nemašykite švirkštu. Pridėkite 1 µl CFDA žymėtujų ląstelių (granulių) į kiekvieną ŽLA II klasės tipavimo plokštelės šulinėlį.
2. Inkubuokite tamsoje 30 minučių 20 iki 25°C temperatūroje. (**Monokloninių DR plokštelės inkubuokite 60 min. at 20 – 25°C temperatūroje ir pereikite prie žingsnio Nr. 5)**
3. Įpilkite į kiekvieną šulinėlį 5 µl DR triušio komplemento.
4. Inkubuokite plokštelę tamsoje 1 valandą 20 iki 25°C temperatūroje.
5. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 5 µl **vieną** iš šių grūdinančių reagentų:
 - a) FluoroQuench™ etidžio bromidą (OLI Kat. Nr. FQEB500), ar
 - b) EB/hemoglobino darbinį tirpalą ar
 - c) EB/1% dažų darbinį tirpalą.
6. Plokštelių rodmenys gali būti analizuojami nedelsiant arba jos gali būti laikomos tamsoje 2 iki 5°C temperatūroje iki 2 dienų.

B. FQAE metodas

1. Maišykite ląstelių ruošinį kratydami granules ir invertuodami mėgintuvėlį. Nemašykite švirkštu. Pridėkite 1 µl ląstelių (granulių) į kiekvieną ŽLA II klasės tipavimo plokštelės šulinėlį.
2. Inkubuokite tamsoje 30 minučių 20 iki 25°C temperatūroje. (Monokloninių DR plokštelės inkubuokite 60 min. 20 iki 25°C temperatūroje ir pereikite prie žingsnio Nr. 5)
3. Įpilkite į kiekvieną šulinėlį 5 µl DR komplemento.
4. Inkubuokite tamsoje 1 valandą 20 iki 25°C temperatūroje.
5. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 5 µl FQAE.
6. Plokštelių rodmenys gali būti analizuojami nedelsiant arba jos gali būti laikomos tamsoje 2 iki 5°C temperatūroje iki 2 dienų.

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

Ląstelių kiekis gali įvairuoti lyginant kiekvieną mėginį, priklausomai nuo ląstelių skaičiaus ir nuo laikotarpio, praėjusio nuo

kraujo mėginio paėmimo. Įvairios ligos gali sąlygoti limfocitų kiekio sumažėjimą. Kai kurie vaistai taip pat gali sąlygoti leukocitų kiekio sumažėjimą ir gali sukelti mažėjančią ŽLA antigenų ekspresiją. Lavoniniai mėginiai gali turėti mažą limfocitų kiekį su padidėjusiu monocitų ir granulocitų užkrėtimu.

Užteršimas kitomis ląstelėmis gali sukelti silpnas/ klaidingas neigiamas reakcijas. Monocitai turi įvairuojantį ŽLA I ir II klasės antigenų kiekį. Trombocitai, turintys ŽLA I klasės antigenų, gali susilpninti antiserumus absorbuodami antikūnus iš antiserumų.

NUMATOMOS REIKŠMĖS

FluoroBeads®-B sudėtyje yra pakankamai imunomagnetinių granulių išskirti daugiau nei 90% CD19+ B ląstelių leukocitų plėvelėje nuo 10 ml pilno kraujo.

SPECIFINĖS EKSPLOATACINĖS SAVYBĖS

Išskirtų leukocitų grynumas turėtų būti daugiau nei 90%. Ląstelės turėtų reaguoti su anti ŽLA serumais ir būti lizuojamos pagal normines limfocitotoksinių tyrimų sąlygas.

EC REP | GLIOTASIS ATSTOVAS EUROPOJE

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, D-30175 Hanoveris, Vokietija

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Revisione	Data	Descrizione della revisione
9	2011/04	Peržiūrėtas katalogo sąrašas (katalogo identifikatoriaus numeris FB-25 pakeistas į FB2-25). NCR Nr. 1454.
10	2011/09	Pašalintas kataloginis identifikatorius (ID) FB2-40



PRODUCT INSERT

REF FLUOROBeads®-T AND FLUOROBeads®-T DEVELOPER Catalog #s FB1-25, FB1-100, and FB1-DEV

IVD For In Vitro Diagnostic Use.

i INTENDED USE

FluoroBeads®-T provide a simple procedure for the isolation of T lymphocytes for use in microcytotoxicity assays using fluorescent dyes. FluoroBeads®-T Developer is specifically designed to be used in the FluoroBeads®-T isolation method.

SUMMARY AND EXPLANATION

FluoroBeads®-T are immunomagnetic beads which are less than 1 micron in diameter. The anti-CD2 monoclonal antibodies coupled to the bead surface specifically bind to the E-rosette receptor on T lymphocytes. FluoroBeads®-T offer the user a quick method of separating T lymphocyte/FluoroBeads®-T complexes from blood with the use of a collector magnet. The FluoroBeads®-T method requires no cold incubations, rotations, or centrifugations. FluoroBeads®-T Developer is a reagent specifically designed to enhance the performance of FluoroBeads®-T immunomagnetic beads.

PRINCIPLE

Immunomagnetic beads are superparamagnetic particles with monoclonal antibodies coupled to their surface. The beads can be collected using a magnetic field. When the magnetic field is removed, the beads do not retain any residual magnetism. They can be repeatedly magnetized and redispersed. The specificity of the coupled monoclonal antibody determines the type of cell collected.

REAGENTS

A. Identification

FluoroBeads® are superparamagnetic particles coupled to monoclonal antibodies, and suspended in PBS with stabilizers and sodium azide as a preservative. The monoclonal antibodies are of murine origin. The FluoroBeads Developer contains non-toxic proprietary ingredients.

4. Refer to Material Safety Data Sheet for detailed information.

C. Instructions for Use

See DIRECTIONS FOR USE on page 3.

D. Storage Instructions

Store reagents at temperature indicated on package. Use before printed expiration date.

E. Purification or Treatment Required for Use

FluoroBead®s-T: Resuspend before use by vortexing for 10 seconds.

Developer: Dilute one part (10X) stock solution to nine parts 1X PBS without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ salts. Store at 2 – 5°C.

F. Instability Indications

FluoroBeads®-T: Do not use if the beads are clumped. Severe clumping of the beads may indicate deterioration of the product.

Developer: 10X Developer should be a slightly colored clear solution. Formation of precipitates may indicate instability or bacterial contamination.



B. Warning or Caution

1. **WARNING:** All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test method can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents.
2. **WARNING:** This reagent contains 0.01% sodium azide which under acidic conditions yields hydrazonic acid, an extremely toxic compound. Reagents containing sodium azide should be diluted in running water prior to being discarded. These conditions are recommended to avoid deposits in plumbing where explosive conditions may develop.
3. **CAUTION:** Do not use lithium heparin or EDTA as an anticoagulant for your blood sample.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Draw approximately 10 ml of whole blood. The preferred anticoagulant is ACD or CPDA. **Do not use lithium heparin!** T cells should be isolated within 24 hours to achieve the highest yield. However, blood up to 3 days old can be used. Store blood specimen horizontally at room temperature (20 – 25°C).

One Lambda | Product Insert: FluoroBead®-T and FluoroBeads®-T Developer

PROCEDURE

A. Materials Provided

1. FluoroBeads®-T
2. Instructions for cell isolation and testing
3. FluoroBeads®-T Developer (10X). See "Purification or Treatment Required for Use" for 1X instructions.

B. Materials Required, But Not Provided

1. Class I tissue typing trays (One Lambda or equivalent)
2. 5 ml and 1.5 ml plastic or glass centrifuge tubes with caps
3. Phosphate Buffered Saline (PBS) without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ salts (i.e., Irvine Scientific Cat. #9242)
4. McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS
5. Magnetic separator (One Lambda or equivalent)
6. Aspirator or disposable pipettes
7. Heat-Inactivated Fetal Calf Serum (HIFCS)
 - a) Stock solution: heat FCS at 56°C for 30 minutes to inactivate complement. Store at 2 - 5°C or aliquot and freeze at -20°C.
 - b) Working solution: add 5 ml HIFCS stock solution to 95 ml of McCoy's medium or equivalent.

C. Optional Materials Not Provided

1. Ficoll-Hypaque
2. Percoll
 - a) Stock solution (Percoll-X): combine 1 part of 10X PBS and 9 parts of Percoll.
 - b) Working solution (50% Percoll): combine equal parts of Percoll-X and PBS.
3. Stain/Quench Reagents:
 - a) Acridine Orange/Ethidium Bromide FluoroQuench™ (OLI Cat. #FQAE500), or
 - b) Ethidium Bromide FluoroQuench™ (OLI Cat. #FQEB500), or

- c) Add 1 ml EB stock solution to 9 ml hemoglobin or 1% ink (See Materials #s 11 - 14).

4. Hemoglobin: Dissolve 10 gm lyophilized hemoglobin in 90 ml 5% EDTA/PBS. Bring volume to 99 ml. Add 1 ml of 1% sodium azide. Centrifuge at 1000 g for 45 minutes. Store supernatant at -20°C.
5. Ink: Dissolve 1 gm bovine serum albumin (BSA) in 10 ml 5% EDTA/PBS add 0.1 ml 1% sodium azide and 0.1 ml Higgins Black Calligraphy Ink.
6. 1% Sodium Azide: Dissolve 1 gm sodium azide in 100 ml PBS.

Caution: Sodium Azide is toxic. Always wear protective equipment when handling.

7. 5% Disodium Ethylenediamine-tetraacetic Acid (EDTA)/PBS: Add 5 gm EDTA to 90 ml PBS. Adjust pH to 7.2 with 10 M NaOH to dissolve EDTA. Bring volume to 100 ml with PBS.
8. Ethidium Bromide (stock solution): dissolve 50 mg in 1 ml distilled water. Add 49 ml PBS. Heat in water bath at 56°C for 30 min. Aliquot and freeze at -20°C.
9. Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA):
 - a) Stock CFDA solution: In a glass tube, dissolve 10 mg CFDA in 1 ml acetone. Store at -20°C. Store in dark.
 - b) Working solution: Use either of the following:
 - Prepared in PBS at pH 7.2: Add 30 µl stock CFDA solution to 5 ml PBS (pH 7.2). Store at 2 - 5°C for up to 1 week.
 - Prepared in PBS at pH 5.5: Add 30 µl stock CFDA solution to 5 ml PBS (pH 5.5). Store at 2 - 5°C for up to 1 week.

D. Step-by-step procedure.

See DIRECTIONS FOR USE on page 3.

DIRECTIONS FOR USE

ISOLATION TECHNIQUES

A. Isolation from Whole Blood

1. Dispense 2 ml of blood into a 5 ml tube.
2. Resuspend FluoroBeads®-T thoroughly before use. **Vortex approximately 10 seconds**
3. Add 100 µl FluoroBeads®-T to blood sample. Immediately cap tube and invert 2 - 3 times to disperse magnetic beads.
4. Rotate tube once per second for 3 minutes at 20 - 25°C to allow binding of beads to T cells. **Do not exceed 4 minutes.** Use an end-over-end rotating device or hand-mix.
5. Add 2 ml of 1X developer (see "Treatment Required for Use" instructions above). Cap tube and invert 2 - 3 times to mix. **This is an essential step!**

6. Uncap and place tube in magnetic separator for a full 3 minutes.
7. Remove and discard supernatant with a disposable pipette. Remove tube from magnet.
8. Resuspend cells (beads) with 1 - 2 ml PBS. Gently flick tube to disperse beads. Replace tube in magnetic separator for 1 minute. Remove and discard supernatant. Repeat two times.
9. Proceed to the "Labeling and Cell Concentration Procedures" (below), or resuspend cells (beads) in 0.5 ml of McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.

B. Isolation from Ficoll Interface

1. Centrifuge citrated or heparinized blood for 10 minutes at 400 - 900 g.

One Lambda | Product Insert: FluoroBead®-T and FluoroBeads®-T Developer

2. Collect buffy coat and dilute with an equal volume of PBS. Mix well.
3. Layer a maximum of 2 ml buffy coat/PBS mixture over 1.5 ml of Ficoll-Hypaque (Density (D) = 1.077) in 5 ml tubes and centrifuge for 10 minutes at 1000 g.
4. Collect approximately 1 ml of interface from each tube and transfer into a centrifuge tube. Centrifuge for 1.5 minutes at 3000 g or 10 minutes at 1000 g.
5. Discard supernatant, resuspend pellet in PBS. Centrifuge for 5 minutes at 1000 g (removes the majority of platelets).
6. Discard supernatant with disposable pipette. Resuspend pellet in 1 ml of 20% HIFCS/PBS.
7. Dispense 100 µl of FluoroBeads®-T into sample tube and cap.
8. Rotate sample for 3 minutes at 20 - 25°C.
9. Uncap and place in magnetic separator for 1 minute.
10. Remove and save supernatant in another tube for B lymphocyte isolation with FluoroBeads®-B.
11. Resuspend beads/cells in 1 ml 20% HIFCS/PBS. Gently flick tube to resuspend beads. Place in magnetic separator for 30 seconds. Discard supernatant with a disposable pipette. Repeat 2 times.
12. Proceed to the "Labeling and Cell Concentration Procedures" (below), or resuspend cells (beads) in 0.5 ml McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.

C. Isolation from Frozen Ficoll Interface

1. Thaw whole cells at 56°C (DMSO removal is not required).
2. Layer 0.5 ml of cell suspension over 0.5 ml of 50% Percoll in a 1.5 ml centrifuge tube.
3. Centrifuge at 2000 g for 2 minutes, or at 400 g for 10 minutes.
4. Discard supernatant with disposable pipette.
5. Resuspend cells in 1 ml of 20% HIFCS/PBS.
6. Dispense 100 µl of FluoroBeads®-T into sample tube and cap tube.
7. Rotate sample for 3 minutes at 20 - 25°C.
8. Uncap and place tube in magnetic separator for 1 minute.
9. Transfer supernatant to another centrifuge tube for B lymphocyte isolation with FluoroBeads®-B.
10. Resuspend remaining beads/cells in 1 ml of 20% HIFCS/PBS. Gently flick tube to resuspend beads and place on magnetic separator for 30 seconds. Discard supernatant using disposable pipette. Repeat twice.
11. Proceed to the "Labeling and Cell Concentration Procedures" (below), or resuspend cells (beads) in 0.5 ml of McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.

LABELING AND CELL CONCENTRATION PROCEDURES

A. CFDA Method

1. Uncap and place tube in magnetic separator for 1 minute. Remove supernatant. Wash cells (beads) twice with PBS.
2. Add 0.5 ml of CFDA (working solution pH 5.5) and mix.
3. Incubate tube horizontally in the dark for 10 minutes at 20 - 25°C.
4. Magnetically separate (as described above) and wash cells twice with PBS.
5. Resuspend cells in 0.5 ml of McCoy's medium or equivalent with 5% HIFCS.
6. Add 1 µl of cell suspension to a blank well of a Terasaki tray. Check cell count with a fluorescent microscope. Adjust the concentration to 2×10^6 cells/ml (2,000 cells per well).
7. Samples can be transferred to 1.5 ml tubes and stored horizontally at 2 - 5°C up to 2 days before testing.

B. FQAE Method

1. Add 1 µl of cells (beads) to a well of a Terasaki tray.
2. Add 5 µl of FQAE (OLI Cat. #FQAE-500) to well.
3. Check cell count with a fluorescent microscope. Adjust cell concentration to 2×10^6 cells/ml (2,000 cells per well).
4. Samples can be transferred to 1.5 ml tubes and stored horizontally at 2 - 5°C up to 2 days before testing.

ABC TYPING

A. CFDA Method

1. Mix cell preparation by tapping pellet and inverting tube. Do not mix with a syringe. Add 1 µl of CFDA labeled cells (beads) to each well of an HLA Class I typing tray.
2. Incubate in the dark for 30 minutes at 20 - 25°C. **(For OLI LMT™, incubate for 60 minutes at 20 - 25°C and proceed to Step #5).**
3. Add 5 µl of ABC rabbit complement to each well.
4. Incubate the tray in the dark for 1 hour at 20 - 25°C.
5. To each well, add 5 µl of **one** of the following quenching reagents:
 - a) FluoroQuench™ Ethidium Bromide (OLI Cat. #FQEB500), or
 - b) EB/hemoglobin working solution, or
 - c) EB/1% ink working solution.
6. Trays can be read immediately or stored in the dark at 2 - 5°C for up to 2 days.

B. FQAE Method

1. Mix cell preparation by tapping pellet and inverting tube. Do not mix with a syringe. Add 1

One Lambda | Product Insert: FluoroBead[®]-T and FluoroBeads[®]-T Developer

2. μ l cells (beads) to each well of an HLA Class I typing tray.
2. Incubate for 30 minutes at 20 - 25°C. (For OLI LMT™, incubate for 60 minutes at 20 - 25°C and proceed to Step #5)
3. Add 5 μ l ABC complement to each well.
4. Incubate for 1 hour in the dark at 20 - 25°C.
5. To each well, add 5 μ l of FQAE.
6. Trays can be read immediately or stored in the dark at 2 - 5°C for up to 2 days.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The cell yield will vary with each specimen depending on the cell count and the time since blood collection. Various diseases can cause a decrease in the lymphocyte yield. Some medications can cause a decrease in the lymphocyte yield as well, and may cause a decrease in HLA antigen expression. Cadaveric samples may have low lymphocyte yields with elevated monocyte and granulocyte contamination.

Contamination with other cells can cause weak/false negative reactions. Monocytes have a variable amount of HLA Class I and Class II antigens. Platelets have HLA Class I antigens and can weaken antisera by absorbing the antibodies from the antisera.

EXPECTED VALUES

FluoroBeads[®]-T contain enough immunomagnetic beads to isolate more than 90% of the CD2+ T cells in 1 ml of whole blood.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The purity of the lymphocytes isolated should be over 90%. Cells should be reactive with anti-HLA sera, and be lysed under standard lymphocytotoxicity assay conditions.

EC REP EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, D-30175, Hannover, Germany

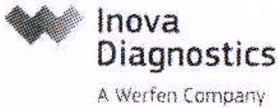
TRADEMARKS AND DISCLAIMERS

® FluoroBeads is a registered trademark of One Lambda, Inc.

REVISION HISTORY

Revision	Date	Revision Description
7	2011/08	Remove Cat ID FB1-40.
8	2013/11	Removed designation (For General Laboratory Use); Replaced with (IVD) symbol and designation (For In Vitro Diagnostic Use). Added second page header. Added a Trademark and Disclaimer section. Formatted all headings to match. Made bulleted sections double columns.





DECLARATION OF CONFORMITY

Inova Diagnostics, Incorporated, 9900 Old Grove Road, San Diego, California 92131-1638, USA declares that the product identified as

QUANTA Lite® Calprotectin ELISA Part Number 704770

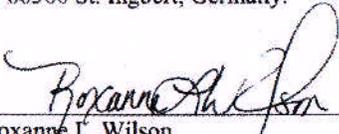
EDMA Code: 12 10 90 90 00 – Other Other Auto-Immune Disease Tests
GMDN Code: 53624 – Calprotectin IVD, kit, enzyme immunoassay (EIA)

and the associated part numbers to which this declaration relates, is in conformity to Annex III provisions of the Council Directive 98/79/EC for *in vitro* diagnostic medical devices. All supporting documentation is retained under the premises of the manufacturer.

Statutory and Regulatory Standard Applied: ISO 13485, ISO 14971, ISO 15223-1, ISO 18113-1, ISO 18113-2, ISO 23640

Product Classification: Non-List A/Non-List B of Annex II and not for self testing.

Our authorized representative in the EU is Medical Technology Promedt Consulting GmbH, Altenhofstrasse 80, D-66386 St. Ingbert, Germany.



Roxanne L. Wilson
On behalf of Ronda Elliott
Vice President, Quality and Regulatory Affairs

1-20-2016
Date Issued

Year CE Mark attached 14
last 2 digits

Associated product part numbers:

504770	Calprotectin antibody coated plate
504771	Washing Solution (20X)
504772	Extraction Solution (2.5X)
504773	Dilution Solution (10X)
504774	Control 1
504775A	Calibrator A
504775B	Calibrator B
504775C	Calibrator C
504775D	Calibrator D
504775E	Calibrator E
504775F	Calibrator F
504776	Enzyme conjugate antibody (IgG)
504778	Substrate
504779	Control 2
704770	QUANTA Lite® Calprotectin ELISA



ONE LAMBDA, INC.

21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 USA Tel: +1 (818) 702-0042 Fax: +1 (818) 702-6904 www.onelambda.com

PRODUKTO INFORMACINIS LAPELIS

FLUOROBeads®-T AND FLUOROBeads®-T DEVELOPER

(FLUOROBeads®-T IR FLUOROBeads®-T RYŠKALAS)

Katalogų Nr.: FB1-25, FB1-100 ir FB1-DEV

REF

IVD

Diagnostikai in vitro.



PASKIRTIS

FluoroBeads®-T pateikia paprastą procedūrą atskirti T limfocitus naudoti mikrocitotoksiškumo tyrimams su fluorescenciniais dažais. FluoroBeads®-T ryškalai specialiai sukurti naudoti FluoroBeads®-T atskyrimo metodu.

SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

FluoroBeads®-T yra imunomagnetinės granulės, kurios yra mažesnės nei 1 mikrono skersmens. Anti-CD2 monokloniniai antikūnai, kloniniai antikūnai poruojasi prie granulės paviršiaus būtent jungdamiesi prie Erozetės formos ląstelių receptorių ant T limfocitų. FluoroBeads®-T siūlo greitą metodą atskirti T limfocitus/FluoroBeads®-T kompleksus iš kraujo, naudojant surenkantįjį magnetą. FluoroBeads®-T metodas nereikalauja šaltų inkubavimų, sukimų ar centrifugavimų. FluoroBeads®-T Ryškalas yra reagentas, skirtas specialiai pagerinti FluoroBeads®-T imunomagnetinių granuliu veikimą.

PRINCIPAS

Imunomagnetinės granulės yra superparamagnetinės dalelės su monokloniniais antikūnais, susiporavusiais prie jų paviršiaus. Granulės gali būti surenkamos naudojant magnetinį lauką. Kai magnetinis laukas yra pašalinamas, granulės neišlaiko jokio liekamojo magnetizmo. Jos gali būti pakartotinai magnetizuotos ir pakartotinai išsklaidytos. Suporuoto monokloninio antikūno specifiskumas lemia renkamų ląstelių tipą.

REAGENTAI

A. Identifikacija

FluoroBeads® yra superparamagnetinės dalelės poromis prisijungusios prie monokloninių antikūnų ir suspenduotos PBS su stabilizatoriais ir natrio azido konservantu. Monokloniniai antikūnai yra pelių kilmės. The FluoroBeads Ryškalo sudėtyje yra nenuodingų patentuotų sudedamųjų dalių.

3. Išsamesnės informacijos ieškokite Medžiagų saugos duomenų lape.

C. Naudojimo taisyklės

Žr. „NAUDOJIMO TAISYKLES“ 3 psl.

D. Laikymo taisyklės

Laikykite reagentus ant pakuotės nurodytoje temperatūroje. Naudokite prieš pasibaigiant atspausdintam galiojimo terminui.

E. Gryninimas ar apdorojimas reikalingas paruošiant naudoti

FluoroBead®-s-T: Resuspenduokite prieš pakratydami 10 sekundžių.

Ry kalas: Atskieskite vieną dalį (10X) pradinio tirpalo su devyniomis dalimis 1X PBS be Ca^{++} ir Mg^{++} drusku. Laikykite 2- 5° C temperatūroje.

F. Nestabilumo indikacijos

FluoroBeads®-T: Nenaudokite, jei granulės yra supuolusios gabalais. Itin supuolusios granulės gali rodyti produkto gedimą.

Ry kalas: 10X ryškalas turėtų būti spalvotas skaidrus tirpalas. Nuosėdų susiformavimas gali rodyti nestabilumą ar užteršimą bakterijomis.

B. Perspėjimas arba atsargos priemonės

- 1. Įspėjimas:** Visi kraujo produktai turi būti laikomi potencialiai užkrečiamais. Atlikus FDA (JAV Maisto ir vaistų administracijos) dabartiniu metu reikalaujamus atlikti testus dėl pirminės medžiagos, iš kurios buvo gautas šis produktas, rezultatai buvo neigiami. Nėra jokių žinomų testų metodų, visiškai užtikrinančių, kad produktai, paruošti naudojant žmogaus kraują, neperneš užkrečiamų agentų.
- 2. Įspėjimas:** Šiame reagente yra 0,01% natrio azido, kuris esant rūgštinėmis sąlygomis išskiria hidrazoninę rūgštį, ypač nuodingą junginį. Reagentai, kurių sudėtyje yra natrio azido, turi būti atskiesti tekančiu vandeniu, prieš juos pašalinant kaip nebetinkamus. Šios priemonės yra rekomenduojamos, siekiant išvengti nuosėdų nutekamuosiuose vamzdžiuose, kur gali susidaryti sprogimą sukeliančios sąlygos.
- 1. ATSARGIAI:** Nenaudokite ličio heparino ar EDTA kaip koagulianto jūsų kraujo mėginiui.



One Lambda | Produkto įklijai: FluoroBead®-T ir FluoroBeads®-T ryškaliai

MĖGINIŲ ĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

Paimkite maždaug 10 ml pilno kraujo. Pageidautina naudoti koagulantą ACD ar CPDA. **Nenaudokite ličio heparino!** T ląstelės turėtų būti atskirtos per 24 valandas, kad būtų gautas didžiausias jų kiekis. Tačiau kraujas gali būti naudojamas iki 3 dienų senumo. Naudokite kraujomėginį horizontalioje padėtyje kambario temperatūroje (20 – 25°C).

PROCEDŪRA

A. Pridedamos medžiagos

1. FluoroBeads®-T
2. Nurodymai dėl ląstelių izoliavimo ir testavimo
3. FluoroBeads®-T Ryškias (10X). Žr. "Gryninimas ir apdorojimas, reikalingas paruošiant naudoti" dėl 1X instrukcijų.

B. Reikalingos medžiagos, kurių nėra pakuotės sudėtyje

4. I klasės audinio tipavimo plokštelės ("One Lambda" ar tolygios)
5. 5 ml ir 1,5 ml plastikiniai ar stiklo centrifugavimo mėgintuvėliai su dangteliais.
6. Fosfatinio buferio druskos tirpalo (PBS) be Ca^{++} ir Mg^{++} druskų (t.y., "Irvine Scientific" Kat. #9242)
7. Mak-Kojaus (McCoy's) terpė ar jai lygiavertė su 5% HIFCS
8. Magnetinis separatorius ("One Lambda" ar lygiavertis)
9. Aspiratorius ar vienkartinės pipetės
10. Karščio inaktyvuotas fetalinis veršelių serumas (HIFCS)
 - a) Pradinis tirpalas: Pakaitinkite FCS 56°C temperatūroje 30 minučių, kad inaktyvuotumėte komplementą. Laikykite 2 – 5°C temperatūroje ar padalinkite į alikvotas ir sušaldykite -20°C temperatūroje.
 - b) Darbinis tirpalas: Įpilkite 5 ml HIFCS pradinio tirpalo į 95 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpę ar jai lygiavertę.

C. Pasirenkamos medžiagos, neįtrauktos į paketo sudėtį

1. Ficoll-Hypaque
2. Perkolis (Percoll)
 - a) Pradinis tirpalas (Percoll-X): Sumaišykite 1 dalį 10X PBS ir 9 dalis Percoll'io.
 - b) Darbinis tirpalas (50% Percoll'io): sumaišykite lygias dalis Percoll-X ir PBS.
3. Dažymo/grūdinimo reagentai
 - a) Akridino oranžo/etidžio bromido FluoroQuench™ (OLI Kat. Nr. FQAE500) ar
 - b) Etidžio bromido FluoroQuench™ (OLI Kat. Nr. FQEB500), ar

- c) Įpilkite 1 ml EB pradinio tirpalo į 9 ml hemoglobino ar 1% rašalo (žr. medžiagas Nr. 11-14).

4. Hemoglobinas: Ištirpinkite 10 g liofilizuoto hemoglobino į 90 ml 5% EDTA/PBS. Papildykite tūrį iki 99 ml. Įpilkite 1 ml 1% natrio azido. Centrifuguokite 1000 g 45 minutes. Laikykite supernatantą -20° C temperatūroje.
5. Dažai: Ištirpinkite 1 g jaučio serumo aldumino (BSA) į 10 ml 5% EDTA/PBS įpilkite 0,1 ml 1% natrio azido ir 0,1 ml "Higgins" juodo kaligrafinio rašalo.
6. 1% natrio azido: Ištirpinkite 1 g natrio azido į 100 ml PBS.
Atsargiai: Natrio azidas yra nuodingas. Visada būkite užsidėję apsaugines priemones, komet liečiate.
7. 5% Etilendiamintetraacetato rūgštis (EDTA)/PBS: Įpilkite 5 g EDTA į 90 ml PBS. Priderinkite pH iki 7,2 su 10 M NaOH ištirpdyti EDTA. Papildykite galutinį tūrį iki 100 ml su PBS.
8. Etid, io bromido (pradinis tirpalas): ištirpinkite 50 mg 1 ml distiliuoto vandens. Pridėkite 49 ml PBS. Pakaitinkite vonelėje su vandeniu 56°C temperatūroje 30 min. Padalinkite į alikvotas ir sušaldykite -20°C temperatūroje.
9. Karboksifluoresceino diacetatas (CFDA):
 - a) Pradinis CFDA tirpalas: Stikliniame mėgintuvelyje ištirpinkite 10 mg CFDA į 1 ml acetono. Laikyti -20° C temperatūroje. Laikyti tamsoje.
 - b) Darbinis tirpalas: Naudokite vieną iš šių:
 - Paruoštą PBS esant pH 7,2: Įpilkite 30 µl pradinio CFDA tirpalo į 5 ml PBS (pH 7,2). Laikykite 2 - 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.
 - Paruoštą PBS esant pH 5,5: Įpilkite 30 µl pradinio CFDA tirpalo į 5 ml PBS (pH 5,5). Laikykite 2 - 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.

D. Etapinė procedūra.

Žr. „NAUDOJIMO TAISYKLES“ 3 psl.

NURODYMAI KAIP NAUDOTI

IZOLIAVIMO METODAI:

A. Išskyrimas iš pilno kraujo

1. Įpilkite 2 ml kraujo į 5 ml mėgintuvėlį.
2. Prieš naudodami kruopščiai resuspenduokite FluoroBeads®-T. **Pakratykite maždaug 10 sekundžių.**

3. Įpilkite 100 µl FluoroBeads®-T į kraujo mėginį. Nedelsiant uždenkite dangteliu ir invertuokite 2-3 kartus, kad išsklaidytumėte magnetines granules.
4. Sukite mėgintuvėlį kartą per sekundę **3 minutes** 20 – 25°C temperatūroje, kad leistumėte granulėms susijungti su T ląstelėmis. **Neviršykite 4 minučių.**

One Lambda | Produkto įklija: FluoroBead®-T ir FluoroBeads®-T ryškakai

Naudokite iš sukamąjį prietaisą („galas pervirš galo“) arba maišykite pasukdami ranka.

- Įpilkite 2 ml 1X ryškalo (žr. „Apdorojimas, reikalingas paruošiant naudoti“ instrukcijas, pateiktas anksčiau). Uždarykite mėgintuvėlį ir invertuokite 2-3 kartus, kad sumaišytumėte. **Tai yra svarbiausias žingsnis!**
- Nuimkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių visas 3 minutes.
- Išimkite ir nusiurbkite supernatantą, naudodami vienkartinę pipetę. Nuimkite mėgintuvėlį nuo magneto.
- Resuspenduokite ląsteles (granules) su 1 – 2 ml PBS. Lengvai stuktelkite į mėgintuvėlį, kad išskirstytumėte granules. Įdėkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę. Išimkite ir pašalinkite supernatantą. Pakartokite du kartus.
- Pereikite prie „Žymėjimo ir ląstelių koncentravimo procedūrų“ (žemiau) arba resuspenduokite ląsteles (granules) 0,5 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.

B. Izoliavimas iš Fikolio terpės sąveikos

- Centrifuguokite citruotą ar heparinizuotą kraują 10 minučių 400 - 900 g.
- Surinkite leukocitų plėvelę ir atskieskite tolygiu PBS kiekiu. Gerai išmaišykite.
- Uždėkite ne daugiau kaip 2 ml leukocitų plėvelės/PBS mišinio sluoksnį virš 1,5 ml. Ficoll-Hypaque (Tankis (D) = 1,077) į 5 ml mėgintuvėlius ir centrifuguokite 10 minučių 1000 g.
- Surinkite maždaug 1 ml sąlyčio paviršiaus iš kiekvieno mėgintuvėlio ir perdėkite į centrifuginį mėgintuvėlį. Centrifuguokite 1,5 minutės 3000 g, arba 10 minučių 1000 g.
- Pašalinkite supernatantą, resuspenduokite granulę PBS. Centrifuguokite 5 minutes 1000 g (pašalina daugumą granulių).
- Naudodami vienkartinę pipetę, pašalinkite supernatantą. Resuspenduokite granulę 1 ml 20% HIFCS/PBS.
- Įpilkite 100 µl FluoroBeads®-T į mėgintuvėlį ir uždenkite dangteliu.
- Sukite mėginį 3 minutes 20 - 25°C temperatūroje.
- Atidenkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę.
- Išimkite ir išsaugokite supernatantą kitame mėgintuvėlyje B limfocitų atskyrimui, naudojant FluoroBeads®-B.
- Resuspenduokite granules/ląsteles 1 ml 20% HIFCS/PBS. Lengvai stuktelkite į mėgintuvėlį, kad resuspenduotumėte granules. Patalpinkite magnetiniame separatoriuje 30 sekundžių. Naudodami vienkartinę pipetę, pašalinkite supernatantą. Pakartokite 2 kartus.
- Pereikite prie „Žymėjimo ir ląstelių koncentravimo procedūrų“ (žemiau) arba resuspenduokite ląsteles (granules) 0,5 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.

C. Izoliavimas iš Fikolio terpės sąveikos

- Atšildykite pilnas ląsteles 56°C temperatūroje (DMSO (dimetilsulfoksidas) pašalinimas nereikalaujamas).
- Uždėkite 0,5ml sluoksnį ląstelių suspensijos virš 0,5 ml 50% Percoll'io 1,5 ml centrifuginiame mėgintuvėlyje.
- Centrifuguokite 2000 g 2 minutes ar 400 g 10 minučių.
- Naudodami vienkartinę pipetę, pašalinkite supernatantą.
- Resuspenduokite ląsteles 1 ml 20% HIFCS/PBS.
- Įpilkite 100 µl FluoroBeads® T į mėgintuvėlį ir uždenkite dangteliu.
- Sukite mėginį 3 minutes 20 - 25°C temperatūroje.
- Nuimkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę.
- Perkelkite supernatantą į kitą centrifuginį mėgintuvėlį B limfocitų atskyrimui, naudojant FluoroBeads®-B.
- Resuspenduokite likusias granules/ląsteles 1 ml 20% HIFCS/PBS. Lengvai pakratykite mėgintuvėlį, kad resuspenduotumėte granules ir uždėkite ant magnetinio separatoriaus 30 sekundžių. Naudodami vienkartinę pipetę pašalinkite supernatantą. Pakartokite dukart.
- Pereikite prie „Žymėjimo ir ląstelių koncentravimo procedūrų“ (žemiau) arba resuspenduokite ląsteles (granules) 0,5 ml Mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.

ŽYMĖJIMO IR LĄSTELIŲ KONCENTRAVIMO PROCEDŪROS

A. CFDA metodas

- Nuimkite dangtelį ir patalpinkite mėgintuvėlį į magnetinį separatorių 1 minutę. Pašalinkite supernatantą. Praplaukite ląsteles (granules) dukart su PBS.
- Įpilkite 0,5 ml CFDA (darbinio tirpalo, pH5,5) ir sumaišykite.
- Inkubuokite mėgintuvėlį horizontalioje padėtyje tamsoje 10 minučių 20 - 25°C temperatūroje.
- agnetiškai atskirkite (kaip paaiškinta anksčiau) ir dukart praplaukite ląsteles su PBS.
- Resuspenduokite ląsteles 0,5 ml mak-Kojaus (McCoy's) terpėje ar jai tolygioje su 5% HIFCS.
- Įpilkite 1 µl ląstelių suspensijos į tuščią Terasaki plokštelės šulinėlį. Fluorescentiniu mikroskopu patikrinkite ląstelių skaičių. Priderinkite koncentraciją 2×10^6 ląstelių/ml (2000 ląstelių viename šulinėlyje).
- Mėginiai gali būti perkelti į 1,5 ml mėgintuvėlius ir laikomi horizontalioje padėtyje 2 - 5°C temperatūroje ne ilgiau nei 2 dienas iki testavimo.

One Lambda |Produkto įklijai: FluoroBead®-T ir FluoroBeads®-T ryškaliai

B. FQAE metodas

1. Įpilkite 1 µl ląstelių (granulių) į Terasaki plokštelės šulinėlį.
2. Įpilkite 5 µl FQAE (OLI Kat. Nr. FQAE-500) į šulinėlį.
3. Fluorescentiniu mikroskopu patikrinkite ląstelių skaičių. Priderinkite koncentraciją prie 2×10^6 ląstelių/ml (2000 ląstelių viename šulinėlyje).
4. Mėginiai gali būti perkelti į 1,5 ml mėgintuvėlius ir laikomi horizontalioje padėtyje 2 - 5°C temperatūroje ne ilgiau nei 2 dienas iki testavimo.
- 5.

ABC TIPAVIMAS

A. CFDA metodas

1. Maišykite ląstelių ruošinį kratydami granules ir invertuodami mėgintuvėlį. Nemašykite švirkštu. Pridėkite 1 µl CFDA žymėtųjų ląstelių (granulių) į kiekvieną ŽLA I klasės tipavimo plokštelės šulinėlį.
2. Inkubuokite tamsoje 30 minučių 20 - 25°C temperatūroje. **(Dėl OLI LMT™ inkubuokite 60 min. at 20 - 25°C temperatūroje ir pereikite prie žingsnio Nr. 5)**
3. Įpilkite į kiekvieną šulinėlį 5 µl ABC triušio komplemento.
4. Inkubuokite plokštelę tamsoje 1 valandą 20 - 25°C temperatūroje.

5. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 5 µl vien iš šių grūdinančių reagentų:
 - a) FluoroQuench™ etidžio bromidą (OLI Kat. Nr. FQEB500), ar
 - b) EB/hemoglobino darbinį tirpalą ar
 - c) EB/1% dažų darbinį tirpalą.
6. Plokštelių rodmenys gali būti analizuojami nedelsiant arba jos gali būti laikomos tamsoje 2 - 5°C temperatūroje iki 2 dienų.

B. FQAE metodas

1. Maišykite ląstelių ruošinį kratydami granules ir invertuodami mėgintuvėlį. Nemašykite švirkštu. Pridėkite 1 µl ląstelių (granulių) į kiekvieną ŽLA I klasės tipavimo plokštelės šulinėlį.
2. Inkubuokite tamsoje 30 minučių 20 - 25°C temperatūroje. (Dėl OLI LMT™ inkubuokite 60 min. at 20 - 25°C temperatūroje ir pereikite prie žingsnio Nr. 5).
3. Įpilkite į kiekvieną šulinėlį 5 µl ABC komplemento.
4. Inkubuokite tamsoje 1 valandą 20 - 25°C temperatūroje.
5. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 5 µl FQAE.
6. Plokštelių rodmenys gali būti analizuojami nedelsiant arba jos gali būti laikomos tamsoje 2 - 5°C temperatūroje iki 2 dienų.

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

Ląstelių kiekis gali įvairuoti lyginant kiekvieną mėginį, priklausomai nuo ląstelių skaičiaus ir nuo laikotarpio, praėjusio nuo kraujo mėginio paėmimo. Įvairios ligos gali sąlygoti limfocitų kiekio sumažėjimą. Kai kurie vaistai taip pat gali sąlygoti leukocitų kiekio sumažėjimą ir gali sukelti mažėjančią ŽLA antigenų ekspresiją. Lavoniniai mėginiai gali turėti mažą limfocitų kiekį su padidėjusiu monocitų ir granulocitų užkrėtimu.

Užteršimas kitomis ląstelėmis gali sukelti silpnas/ klaidingas neigiamas reakcijas. Monocitai turi įvairuojantį ŽLA I ir II klasės antigenų kiekį. Trombocitai, turintys ŽLA I klasės antigenų, gali susilpninti antiserumus absorbuodami antikūnus iš antiserumų.

NUMATOMOS REIKŠMĖS

FluoroBeads®-T sudėtyje yra pakankamai imunomagnetinių granulių išskirti daugiau nei 90% CD19+ T ląstelių leukocitų plėvelėje nuo 1 ml pilno kraujo.

SPECIFINĖS EKSPLOATACINĖS SAVYBĖS

Išskirtų leukocitų grynumas turėtų būti daugiau nei 90%. Ląstelės turėtų reaguoti su anti ŽLA serumais ir būti lizuojamos pagal normines limfocitotoksinių tyrimų sąlygas.

EC REP įgijotasis atstovas europoje

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175 Hanoveris, Vokietija

PREKĖS ŽENKLAI IR ATSAKOMYBĖS APRIBOJIMAI

*FluoroBeads yra „One Lambda, Inc.“ registruotas prekės ženklas.

One Lambda |Produkto įklijai: FluoroBead®-T ir FluoroBeads®-T ryškalai

PERŽIŪROS ISTORIJA

Peržiūra	Data	Peržiūros aprašymas
7	2011/08	Pašalintas katalogo ID FB1-40.
8	2013/11	Pašalintas žymėjimas (naudoti bendrajai laboratorijai); pakeistas (IVD) simboliu ir žymėjimu (naudoti diagnostikai in vitro). Antrame puslapyje pridėta antraštė, Pridėtas prekės ženklo ir garantijos apribojimų skyrius. Suformatuotos visos antraštės, kas būtų vienodos. Skyriai su punktais pakeisti į dvigubus stulpelius.



QUANTA Lite[®] Calprotectin ELISA

For *In Vitro* Diagnostic Use

REF 704770

Rx Only

CLIA Complexity: High



Intended Use

QUANTA Lite Calprotectin is a quantitative ELISA for detecting concentration of fecal calprotectin. QUANTA Lite Calprotectin can be used as an *in vitro* diagnostic to aid in the diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases (IBD, Crohn's disease and ulcerative colitis) and to differentiate IBD from Irritable Bowel Syndrome (IBS) in conjunction with other clinical and laboratory findings.

Summary and Explanation of the Test

Calprotectin¹ is a calcium and zinc binding protein produced by PMNs, monocytes and squamous epithelial cells except those in normal skin.⁶⁻⁸ After binding calcium it can resist degradation by leukocytic and bacterial enzymes.^{2,9} By competing with different enzymes for limited local amounts of zinc, calprotectin may inhibit many zinc dependent enzymes¹⁰ and thereby kill microorganisms or animal and human cells in culture.¹¹⁻¹²

Calprotectin can be detected even in small (less than one gram) random stool samples¹³ Furthermore, organic diseases of the bowel give a strong fecal calprotectin signal, i.e. elevations are often five to several thousand times the upper reference in healthy individuals^{2, 5, 14-15} indicating intestinal inflammation.

Patients with organic or functional abdominal disorders may have similar symptoms, and clinical examination alone may not be sufficient to give a specific diagnosis. Additionally, the QUANTA Lite Calprotectin assay has been demonstrated to be a marker of inflammatory bowel disease in both children and adult patients.¹⁶⁻²⁰

Inflammatory bowel disease (IBD), i.e. ulcerative colitis and Crohn's disease, may appear from early childhood to late adulthood, and the diagnosis is often delayed due to vague symptoms or reluctance to perform endoscopy and biopsy.

Principles of the Procedure

QUANTA Lite Calprotectin is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system with colorimetric detection based on the use of polyclonal antibody against calprotectin. Calprotectin present in the dilute sample is bound by the antibody adsorbed to the surface of the plastic well. The enzyme conjugated antibody binds to the captured antigen and subsequently the enzyme catalyzes the conversion of the substrate to a colored product. The intensity of the color is proportional to the amount of conjugate bound, and thus to the amount of captured calprotectin. Concentration of calprotectin in the samples is calculated using the provided Calibrators.

Reagents

1. Antibody coated plate: 12 strips, 8 well per strip, coated with polyclonal rabbit antibody against calprotectin. The plate is stored in a sealed bag containing a desiccant.
2. Enzyme conjugate antibody (IgG): 1 vial containing 15 ml alkaline phosphatase-labelled IgG antibodies (rabbit) against human calprotectin in a buffer solution with Proclin 300 as a preservative. Ready-to-use.
3. Substrate: 1 vial containing 15 ml substrate reagent with Sodium-azide as a preservative. Ready to use.
4. Washing solution (20x): 1 vial containing 50 ml concentrated washing solution (20x). To be diluted with distilled water.
5. Dilution solution (10x): 1 vial containing 20 ml concentrated diluent solution (10x) to be diluted with distilled water.
6. Extraction solution (2.5x): 2 vials containing 50 ml concentrated extraction solution (2.5x) to be diluted with distilled water. This concentrated solution is irritating to eyes and skin.
7. Calibrators: 6 vials containing 1.0 ml Calprotectin at six known concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 ng/ml). The value of each Calibrator is printed on the vial label. Ready to use.
8. Control 1: 1 vial containing 1.0 ml. Ready to use. Do not dilute. The lot-specific range of values is printed on the vial label and is expressed as ng/ml. Approximate range = 20 - 40 ng/ml or (50 - 100 mg/kg).
9. Control 2: 1 vial containing 1.0 ml. Ready to use. Do not dilute. The lot-specific range of values is printed on the vial label and is expressed as ng/ml. Approximate range = 40 - 80 ng/ml or (100 - 200 mg/kg).
10. Microtiter plate cover, 1 piece.

Precautions and Warnings

1. For *In Vitro* use only.
2. Follow universal precautions. Materials of human origin used in this kit have been tested and confirmed negative for HBsAg and anti-HIV I and II and anti-HCV antibodies. They should be treated as a potential biohazard, and handled and disposed of according to local laboratory legislation.

3. Reagents, samples and microtiter strips should be allowed to reach room temperature (20-25°C) before starting the test.
4. Warning: do not interchange components from the different kit batches. Satisfactory performance of the test is guaranteed only when components from the same batch of QUANTA Lite Calprotectin are used.
5. The substrate reagent contains sodium azide as preservative at concentrations less than 0.1 % (w/w). On disposal, flush with large volumes of water to prevent the build-up of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.
6. Substrate reagent should be pale yellow. Substrate is light sensitive, store in the dark and shake before use.
7. Unused microtiter strips should be re-sealed airtight in the plastic bag with the enclosed desiccant and stored at 2-8°C.
8. Insufficient washing of the ELISA plate can lead to erroneous values of Calprotectin due to incomplete removal of reagents. Routine maintenance of aspiration/wash system is strongly recommended.
9. When handling extraction buffer, wear suitable protective clothing. In case of contact with eyes rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
10. All reagents, except to the substrate and the concentrated washing solution, contain Proclin 300 as a preservative agent below the allowed limits.
11. Adaptation of this assay for use with automated sample processors and other liquid handling devices, in whole or in part, may yield differences in test results from those obtained using the manual procedure.

Storage Conditions

1. All reagents and working solutions must be stored at 2-8°C.
2. The expiration date is printed on all component labels.
3. Avoid exposure to high temperature, direct sunlight or extreme humidity.
4. Unused microtiter strips should be resealed airtight in the plastic bag with the desiccant inside and stored at 2-8°C.

Reagent stability (unsealed reagents)

Reagent	Storage conditions	Storage time
Conjugate	2-8 °C	30 days
Substrate	2-8 °C	90 days
Calibrators	2-8 °C	30 days
Controls	2-8 °C	30 days

The Substrate reagent is light sensitive and should be pale yellow. Store in the dark and shake before use.

Stability of working solutions

Reagent	Storage conditions	Storage time
Washing solution	20-25 °C	30 days
Extraction solution	2-8 °C	90 days
Dilution solution	2-8 °C	30 days

Specimen Collection

Random stool collection. Loose or liquid stool samples are acceptable as normalization to stool weight is part of the calculation of the result. Submission of stool samples from diapers should be avoided unless the sample submitted can be taken from a portion of the stool which is not in contact with the diaper material.

Sample requirements:

1. 1-5 g stool in a screw-top clean vial. No preservative is necessary or indicated.
2. Sample transport: Stool specimen should be received by the laboratory within 10 days of collection. Temperature during shipment should not exceed 30°C. Sample must be extracted within 10 days of collection.
3. Sample storage: Samples may be stored at 2-8°C for up to 4 days before testing. If samples will not be tested within 4 days, freeze stored samples at -20°C.

Note: Individual laboratories may choose to perform their own studies or utilize references to determine specimen sample stability criteria for their laboratory.

Procedure

Additional Materials Required But Not Provided

Feces sample collection

1. Sample collection tube

2. Transport container

Feces preparation

1. Disposable, breakable sterile inoculation loops or wooden stick
2. Disposable polystyrene screw cap tubes, 14 ml
3. Eppendorf tubes (1 + 1.5 ml)
4. Sensitive digital scale (40-150 mg)
5. Vortex mixer
6. Shaker
7. Microcentrifuge (10,000g)
8. Freezer (-20°C)

Equipment for ELISA measurements

1. Multi-channel pipette, 50-200 µl
2. ELISA plate washer
3. ELISA plate reader (filter 405 nm)
4. Distilled water
5. Stop solution (NaOH 1M)

Method

Before you start

Bring all reagents and samples to room temperature (20 -25°C) and mix well.

1. Extraction buffer: Dilute concentrated Extraction solution by adding 1 part (50 ml) of it to 1.5 parts (75 ml) of freshly distilled water to obtain 125 ml working solution. Mix well.
2. Diluent buffer: Dilute concentrated Dilution solution by adding 1 part (20 ml) of it to 9 parts (180 ml) of distilled water to obtain 200 ml working solution. Mix thoroughly.
3. Washing solution: Prepare the washing solution by diluting the content of the whole vial (50 ml) with distilled water to a final volume of 1000 ml.

Sample Preparation

1. Thaw frozen stool samples at room temperature and ensure that all reagents reach room temperature (20-25°C).
2. Weigh (tare) the empty screw cap tube together with the inoculation loop or the wooden applicator stick.
3. Take out approx. 100 mg (between 80 - 120 mg) feces by means of the inoculation loop or wooden applicator stick, and place into a screw-cap-tube.
4. Weigh tube and loop with feces and calculate net feces weight (between 80 - 120 mg).
5. Break off the loop handle or the wooden applicator stick, leaving the loop or wooden stick with feces and a 4-6 cm handle inside the screw cap tube.
6. Add pre-diluted extraction buffer (weight/volume ratio 1:50), e.g. 100 mg feces + 4.9 ml diluted extraction solution as described in the table below. Close the tube.

Stools (mg)	Extraction solution (ml)
120	5.9
115	5.6
110	5.4
105	5.2
100	4.9
95	4.7
90	4.4
85	4.2
80	3.9

7. Shake/mix vigorously for 30 seconds by means of a vortex.
8. Homogenise 25 ± 5 minutes on a shaker or roller. The inoculation loop or the wooden stick inside the tube will act as an agitator.
9. Transfer the homogenate (1 ml) to an Eppendorf tube and centrifuge for 20 min. at 10,000 at RT using a bench-top centrifuge.
10. Transfer 0.5 ml of the clear extract supernatant to a new Eppendorf tube. Avoid contact with the pellet as aggregates or particles can cause erroneous calprotectin values.
11. The extracts may be tested immediately or stored at -20°C (up to three months) for later measurement.

Assay procedure

1. Ensure that all reagents reach room temperature (20-25°C).
2. Thaw frozen sample at room temperature.
3. Dilute samples 1:50 (20 µl sample + 980 µl dilution buffer). For further dilution of high concentration samples, dilute the sample to a final 1:250 dilution (e.g. 200 µl of the 1:50 dilution + 800 µl dilution buffer).
4. Suggested plate layout in duplicates is shown below. Fit the strip holder with the required number

of micro ELISA strips. Use uncoated strips to complete the strip holder if the washer requires a full plate. Blank, Calibrators and controls must be included in each run.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blank	Calibrator D	Control.2	Sample 4	Sample 8	Sample 12	
B	Blank	Calibrator D	Control.2	Sample 4	Sample 8	Sample 12	
C	Calibrator A	Calibrator E	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	
D	Calibrator A	Calibrator E	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	
E	Calibrator B	Calibrator F	Sample 2	Sample 6	Sample 10		
F	Calibrator B	Calibrator F	Sample 2	Sample 6	Sample 10		
G	Calibrator C	Control.1	Sample 3	Sample 7	Sample 11		
H	Calibrator C	Control.1	Sample 3	Sample 7	Sample 11		

- Add 100 µl of Dilution buffer to wells A1-B1 (blank).
- Add 100 µl of each Calibrator in duplicate wells (C1-D1, E1-F1, G1-H1, A2-B2, C2-D2, E2-F2).
- Add 100 µl of each control in duplicate wells (G2-H2, A3-B3).
- Mix diluted sample well before application to the plate and add 100 µl of each sample in duplicate wells (C3-D3, E3-F3...).
- Cover plate with plate cover and incubate at room temperature for 45 ± 5 min.
- At the end of the incubation time, wash the plate by adding 0.4 ml of diluted washing solution to each well. Repeat this step two more times up to a total of 3 washing steps. After the final aspiration, invert plate and tap gently on absorbent tissue to ensure complete removal of washing solution. Remove as much liquid as possible.
- Add 100 µl of conjugate to each well. Note: a multi-channel pipette is recommended in order to avoid variation.
- Cover plate with plate cover and incubate at room temperature for 45 ± 5 min.
- Repeat washing step as above (see 10).
- Add 100 µl of substrate solution to each well.
- Incubate the plate at room temperature for approx. 30 minutes in a dark place or wrap the plate with an aluminium foil.
- Read the OD values by means of an ELISA reader at 405 nm. When Calibrator F reaches an OD value between 1.8-2.1, the reaction should be read with an automatic EIA reader or stopped by adding 100 µl 1M NaOH stop solution. Plates stopped with 1M NaOH may be stored at 4°C for 24 hours. If the OD reading of Calibrator F is outside 1.8-2.1, the assay is considered valid if all the criteria outlined in the Quality Control section are met.

Quality Control

- A new calibration curve is used with each run.
- The plate background should be < 0.2 OD
- Control 1 and 2 are to be included in each run.

Calculation of Results

Calculate the mean optical densities (OD) for each sample duplicate. Subtract the mean Blank OD from all values. Plot the Calibration curve with actual calprotectin concentration of Calibrators as ng/ml and corresponding mean OD values on an x-y system using a linear/linear Cubic Spline or point-to-point line fit.

The readings of the Samples from the Calibration curve is corrected for the dilution and converted to mg/kg by multiplying 2.5 (e.g. a reading of 50 ng/ml becomes 125 mg/kg). If samples are further diluted this must be compensated for during calculations. Concentrations can also be determined by use of a computer linked to the ELISA reader.

The analytical sensitivity of QUANTA Lite Calprotectin is 6.25 ng/ml, which corresponds to 15.6 mg calprotectin/kg feces at a sample dilution of 1:2500.

Interpretation of Results

A cut-off study was performed internally and provided the value reported in the table below:

Calprotectin Concentration	Interpretation	Follow-Up
<15.6 - 50 mg/kg	Normal	None
50 - 120 mg/kg	Borderline	Re-evaluate at 4-6 weeks
>120 mg/kg	Abnormal	Repeat as clinically indicated

Further evaluations including asymptomatic patients, as well as patients with IBS (to differentiate from IBD) and international studies^{5, 13, 19-22} confirmed the appropriateness of such values.

Limitations of the Procedure

1. False-negative results could occur in patients who have granulocytopenia due to bone marrow depression.
2. Some patients who are taking NSAIDs will have elevations in their fecal calprotectin levels.¹⁷
3. Patients with IBD fluctuate between active (inflammatory) and inactive stages of the disease. These stages must be considered when using the QUANTA Lite Calprotectin assay.
4. The use of proton pump inhibitors (PPIs), microscopic colitis and diverticular disease may also lead to elevated calprotectin level. Patients affected by untreated coeliac disease may occasionally show elevated calprotectin value.²²
5. Other intestinal impairments, including many gastrointestinal infections and colorectal cancer, can result in elevated levels of calprotectin. These specimens will test positive with the QUANTA Lite Calprotectin assay. Therefore, a diagnosis of active IBD cannot be established solely on the basis of a positive result with the QUANTA Lite Calprotectin assay.
6. Fecal calprotectin is an indicator of neutrophilic presence in the stool and is not specific for IBD.

Specific Performance Characteristics and Clinical Studies

Summary of Clinical Studies

For the QUANTA Lite Calprotectin assay, the clinical study included 138 samples, of which 98 patients affected by Crohn disease, Ulcerative and Intermediate Colitis and 40 are negative samples from Irritable Bowel Syndrome (IBS), Recurrent Abdominal Pain (RAP) and other disease patients. The positive patient samples were diagnosed by means of clinical findings and/or confirmed with colonoscopy. Tables 1 and 2 below demonstrate the clinical performance of the QUANTA Lite Calprotectin assay.

Table 1: Clinical Performance of QUANTA Lite Calprotectin assay (with QUANTA Lite Calprotectin borderline sample values considered positive with a cut-off of 50 mg/kg).

		IBD		Total
		Positive	Negative	
QUANTA Lite Calprotectin®	Positive	95	6	101
	Negative	3	34	37
	Total	98	40	138
Sensitivity		96.9%	95%C.I. [§] (91.3% - 99.4%)	
Specificity		85.0%	95%C.I. (70.2% - 94.3%)	
PPV*		94.1%	95%C.I. (87.5% - 97.8%)	
NPV**		91.9%	95%C.I. (78.1% - 98.3%)	

Table 2: Clinical Performance of QUANTA Lite Calprotectin assay (with QUANTA Lite Calprotectin borderline sample values considered negative with a cut-off of 120 mg/kg).

		IBD		Total
		Positive	Negative	
QUANTA Lite Calprotectin®	Positive	78	3	81
	Negative	20	37	57
	Total	98	40	138
Sensitivity		79.6%	(95% CI 70.3% - 87.1%)	
Specificity		92.5%	(95% CI 79.6% - 98.4%)	
PPV*		96.3%	(95% CI 89.6% - 99.2%)	
NPV**		64.9%	(95% CI 51.1% - 77.1%)	

* PPV: Positive Predictive Value

** NPV: Negative Predictive Value

§ C.I.: Confidence Interval

Method Comparison

A comparison study was performed which compared the QUANTA Lite Calprotectin to a comparator test using 131 clinical samples. These samples consist of clinically diagnosed IBD and IBS patients (clinical history and/or biopsy) and negative samples. The negative samples were obtained from patients with IBS or other diseases. All samples were tested with the QUANTA Lite Calprotectin (y) and the predicate device (x) according to their corresponding package inserts. The results are summarized in Table 3, 4, and 5.

Table 3: Deming Regression Analysis

	Slope (95% CI)	y-intercept (95% CI)
$y = 0.98x - 1.85$	0.98 (0.96 to 1.01)	-1.85 (-3.96 to 0.96)

Table 4: Method comparison (with calprotectin borderline sample values considered positive with a cut-off of 50 mg/kg).

Borderline Value considered as Positive		PhiCal™		
		Pos	Neg	
QUANTA Lite Calprotectin	Pos	74	1	75
	Neg	4	52	56
		78	53	
Positive Agreement	94.9%	(95% C.I. 87.4% - 98.6%)		
Negative Agreement	98.1%	(95% C.I. 89.9% - 100.0%)		
Overall agreement	96.2%	(95% C.I. 91.3% - 98.7%)		

Table 5: Method comparison (with calprotectin borderline sample values considered negative with a cut-off of 120 mg/kg).

Borderline Value considered as Negative		PhiCal™		
		Pos	Neg	
QUANTA Lite Calprotectin	Pos	43	2	45
	Neg	4	82	86
		47	84	
Positive Agreement	91.5%	(95% C.I. 79.6% - 97.6%)		
Negative Agreement	97.6%	(95% C.I. 91.7% - 99.7%)		
Overall agreement	95.4%	(95% C.I. 90.3% - 98.3%)		

Precision and Reproducibility

1. Extraction Reproducibility

In order to determine the extraction-to-extraction reproducibility, three samples (1 positive, 1 around cut-off and 1 negative) were extracted 10 times each, and each extract tested in duplicate. The results are reported below.

	Extracted stool sample #		
	1	2	3
Mean (mg/kg)	28.4	41.1	79.4
SD	3.9	3.7	5.6
% CV	13.6	8.9	7.0

2. Intra-assay precision

The study has been carried out by extracting 8 different stool samples (6 positive, 1 around cut-off and 1 negative) and assaying each extract in 10 replicates during the same run.

Extracted stool sample #	1	2	3	4	5	6	7	8
Mean (mg/kg)	438.7	355.2	352.9	311.7	199.9	125.7	57.8	27.7
SD	33.7	43.0	43.7	38.8	6.6	9.8	2.9	1.0
CV%	7.7	12.1	12.4	12.4	3.3	7.8	5.0	3.7

3. Inter-assay precision

The study has been carried out by extracting 8 different stool samples (5 positive, 1 around cut-off and 2 negative) and assaying each extract in 5 replicates, using one lot of the test kit, in 6 different runs over 6 consecutive days (one run per day).

Extracted stool sample #	1	2	3	4	5	6	7	8
Mean (mg/kg)	359.9	209.8	185.5	117.0	70.4	48.8	40.9	20.6
SD	27.5	17.8	17.8	9.3	6.8	4.5	3.4	2.6
CV%	7.7	8.5	9.6	8.0	9.6	9.3	8.2	12.4

4. Inter-lot test precision

The study has been carried out by extracting 6 different stool samples (3 positive, 2 around cut-off and 1 negative) and assaying each extract in 5 replicates, using 3 different lots of the test kit.

Extracted stool sample #	Lot # 5637		Lot # 5888		Lot # 5488		Overall		
	Mean (mg/kg)	CV%	Mean (mg/kg)	%CV	Mean (mg/kg)	%CV	Mean (mg/kg)	SD	%CV
1	106.1	5.2	103.2	2.8	113.9	1.3	107.7	5.779	5.4
2	63.4	4.7	60.4	2.2	65.5	6.8	63.1	3.682	5.8
3	185.0	3.5	177.7	13.3	192.6	0.8	185.1	14.545	7.9
4	44.0	2.3	43.5	4.2	43.8	3.2	43.8	1.358	3.1
5	36.5	3.9	38.2	7.3	33.2	7.2	36.0	3.001	8.3
6	340.0	12	354.6	13.6	340.2	13.7	344.9	42.615	12.4

5. Accuracy / Recovery

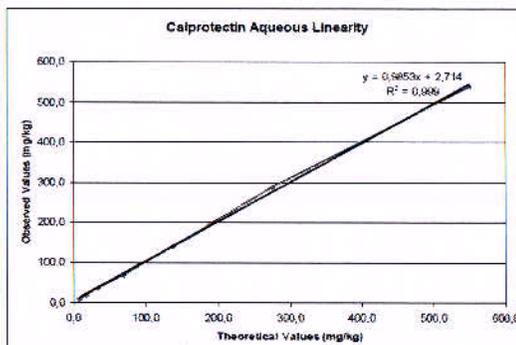
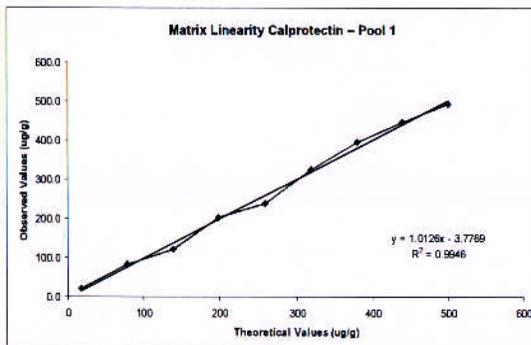
The study was carried out by testing 7 different stool samples. Each extracted stool sample was "spiked" with an equal and constant quantity/volume of calprotectin (Calibrator C diluted 1:1) or with an equal volume of sample diluent to compensate for volume adjustments. Each Calprotectin-spiked extract was assayed in triplicate. Data are shown in table below.

	Calprotectin Recovery Data								
	Sample #	1	2	3	4	5	6	7	
Baseline	(mg/kg)	18.3	47.5	59.4	66.5	115.2	232.5	421.9	
Spike Value	(mg/kg)	31.2	31.2	31.2	31.2	31.2	31.2	31.2	
Theoretical (Base + Spike)	(mg/kg)	49.6	78.8	90.6	97.8	146.4	263.7	452.1	
Observed (Base + Spike)	(mg/kg)	49.8	81.1	100.1	108.7	166.0	271.3	475.0	
Recovery	(%)	100.5	103.0	110.5	111.1	113.4	102.8	112.6	

Linear Range

3 high positive extracted stool samples, 3 low concentration extracted stool samples around the level of LOD (6.85 mg/kg) or a calprotectin reference material for Calprotectin kit were used in the study. The 3 high positive extracted stool samples were pooled (H) and diluted with a pool of the three low concentration extracted stool samples (L). The results of the assessment of the linearity ranges show that QUANTA Lite Calprotectin has both acceptable linearity and accuracy from 20.4 - 492.8 mg/kg for matrix and from 8.2 - 538.5 mg/kg for aqueous linearity.

However, it was decided to limit the reportable range to the values of the lowest and highest calibrators contained within the assay kit (6.25 - 200 ng/ml (15.6 - 500 mg/kg))



Matrix Linearity					
	Test Range (mg/kg)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% Recovery Rate (Obtained/Theoretical)
Pool #.1	20.4 to 492.8	1.0126 (0.95 to 1.08)	-3.77769 (-23.85 to 16.29)	0.9946	87.0% to 113.2%

Aqueous Linearity					
	Test Range (mg/kg)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% Recovery Rate (Obtained/Theoretical)
Pool #.2	8.2 to 538.5	0.9853 (0.9498 to 1.0208)	2.714 (-5.813 to 11.241)	0.999	95.2% to 109.3%