



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO"
CASERTA

Determina Dirigenziale N. 404 del 31/05/2023

Proponente: Il Direttore UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

Oggetto: Fornitura di test ex art. 2 com. 1 lett. a) del D. Lgs. 76/2020 convertito con L. 120/20250 e s.m.i., finalizzati alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell'infezione da SARS-Cov. 2.

PUBBLICAZIONE

In pubblicazione dal 31/05/2023 e per il periodo prescritto dalla vigente normativa in materia (art.8 D.Lgs 14/2013, n.33 e smi)

ESECUTIVITA'

Atto immediatamente esecutivo

TRASMISSIONE

La trasmissione di copia della presente Deliberazione è effettuata al Collegio Sindacale e ai destinatari indicati nell'atto nelle modalità previste dalla normativa vigente. L'inoltro alle UU. OO. aziendali avverrà in forma digitale ai sensi degli artt. 22 e 45 D.gs. n° 82/2005 e s.m.i. e secondo il regolamento aziendale in materia.

UOC AFFARI GENERALI

Direttore Eduardo Chianese

ELENCO FIRMATARI

Teresa Capobianco - UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

Carmela Zito - UOC GESTIONE ECONOMICO FINANZIARIA

Eduardo Chianese - UOC AFFARI GENERALI

Oggetto: Fornitura di test ex art. 2 com. 1 lett. a) del D. Lgs. 76/2020 convertito con L. 120/20250 e s.m.i., finalizzati alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell'infezione da SARS-Cov. 2.

Direttore UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

A conclusione di specifica istruttoria, descritta nella narrazione che segue, si rappresenta che ricorrono i presupposti finalizzati all'adozione del presente provvedimento, ai sensi dell'art. 2 della Legge n. 241/1990 e s.m.i. e, in qualità di responsabile del procedimento, dichiara l'insussistenza del conflitto di interessi, ai sensi dell'art. 6 bis della legge 241/90 e s.m.i.

PREMESSO CHE

- quest'AORN, con Deliberazione del D.G. n. 409/2023 del 05/05/2023 (agli atti), ha – tra l'altro – approvato lo schema di Convenzione stipulato tra il Dipartimento Medicina di Precisione dell'Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli e la U.O.C. Immunoematologia e Centro Trasfusionale per l'espletamento delle fasi sperimentali del progetto dal titolo "*Analisi molecolare e tipizzazione linfocitaria finalizzata al monitoraggio della memoria immunitaria nell'infezione da SARS-Cov-2*";
- il Direttore della predetta UOC, nel precisare che (Prot. 0014008/i del 08/05/2023 - All. n.1) "*l'AOU L. Vanvitelli ha accreditato a quest'AORN euro 28.000 finalizzati alla consulenza del personale e all'acquisto dei reagenti*", ha richiesto al Servizio scrivente la fornitura di "*test di tipizzazione linfocitaria finalizzata alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell'infezione da SARS-Cov.2*", giusta fabbisogno dallo stesso determinato;
- tale Direttore, nel richiamare il contratto in essere (contratto informatico n. 4600074883) con la *Beckman Coulter S.r.l.*, ha dichiarato che tale Ditta può essere interpellata per la fornitura di "*test finalizzati alla ricerca scientifica*" in parola (già allegato n.1);

VISTE

- la deliberazione del DG n. 86/2020 concernente l'aggiudicazione, previa procedura aperta, in favore della Ditta Beckman Coulter S.r.l. "*della fornitura in noleggio triennale di un Citofluorimetro con somministrazione del materiale di consumo*";
- la successiva deliberazione del DG n.306/2021, con cui tra l'altro si è proceduto alla stipula del contratto derivante dalla suddetta aggiudicazione;

DATO ATTO CHE

- è in corso di esecuzione il contratto in essere con la precitata Ditta, come viene in evidenza dalla consultazione della piattaforma SAP (contratto informatico n. 4600074883 con scadenza al 01.11.2024 - All. n.2);

Determinazione Dirigenziale

RILEVATO CHE

- la UOC Provveditorato – Economato con nota Prot. 0014120/U del 09/05/2023 (All. n.3), ha quindi invitato la Ditta Beckman Coulter Srl a presentare offerta per la seguente fornitura:
 - a) n. 4 CFZ (25 test) Duraclone IM B Cell;
 - b) n. 4 CFZ (25 test) Duraclone IM T Cell;
 - c) n. 15 CFZ (100 test) Versalyse;
 - d) n. 10 CFZ Soluzione Elettrolitica non fluorescente;
 - e) n. 15 CFZ Provette PP Citometria 12x75 mm;
- in data 12/05/2023, la Ditta interpellata a tanto ha provveduto, manifestando - tramite pec la disponibilità alla fornitura *de qua* (All. n. 4) per l'importo complessivo di € 12.480,00, IVA esclusa al 22%, come di seguito indicato:

Descrizione prodotto	Unità di misura	Quantità	Prezzo di listino	% di sconto praticato sul prezzo di listino	Prezzo unitario offerto	Importo totale prodotto IVA ESCLUSA 22%
Duraclone IM B Cell Tube	25 test	4	€ 2.051,00	% 35,64	€1.320,00	€ 5.280,00
Duraclone IM T Cell subsets Tube	25 test	4	€ 2.793,00	% 35,55	€ 1.800,00	€ 7.200,00
Versalyse Lysing Solution	100 test	15	€ 222,40	% 100	-	-
Isoflow Sheath Fluid	10 litri	10	€ 61,70	% 100	-	-
Provette in Polipropilene	1000 pezzi	4	€ 38,50	% 100	-	-
						TOTALE IVA ESCLUSA
						€12.480,00

CONSIDERATO CHE

- al fine di salvaguardare il regolare svolgimento dell'istruttoria in questione, il Direttore della U.O.C. richiedente ha verificato (mail del 15.05.2023 - All. n.5 e mail del 15.05.2023- All. n.6) - sulla base delle schede tecniche di pertinenza - la conformità dell'offerta pervenuta;

Determinazione Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.

- il precitato Direttore ha anche precisato che la strumentazione (recte: Del DG nn. 86/2020 e 306/2021) presso la Sua UOC “è compatibile con i reagenti richiesti ...e per tale attività non vi è altra strumentazione” presso la stessa Struttura, come emerge dalla consultazione (già allegato n.6);

ESAMINATA tutta la documentazione innanzi richiamata, allegata alla presente ed in atti giacente;

RITENUTO pertanto, di affidare ex art. 2 com. 1 lett. a) del D. Lgs. 76/2020 convertito con L. 120/20250 e s.m.i., alla Ditta Beckman Coulter S.r.l., la fornitura di “test di tipizzazione linfocitaria finalizzata alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell’infezione da SARS-Cov.2” (Cfr. Del. DG. n.409/2023), finalizzata alla ricerca scientifica *de qua*, secondo la configurazione di offerta e per l’importo complessivo di € 12.480,00 IVA esclusa, al 22%, così dettagliato:

Descrizione prodotto	Unità di misura	Quantità	Prezzo di listino	% di sconto praticato sul prezzo di listino	Prezzo unitario offerto	Importo totale prodotto IVA ESCLUSA 22%
Duraclone IM B Cell Tube	25 test	4	€ 2.051,00	% 35,64	€1.320,00	€ 5.280,00
Duraclone IM T Cell subsets Tube	25 test	4	€ 2.793,00	% 35,55	€ 1.800,00	€ 7.200,00
Versalyse Lysing Solution	100 test	15	€ 222,40	% 100	-	-
Isoflow Sheath Fluid	10 litri	10	€ 61,70	% 100	-	-
Provette in Polipropilene	1000 pezzi	4	€ 38,50	% 100	-	-
						TOTALE IVA ESCLUSA
						€12.480,00

ATTESTATO CHE la presente determinazione è formulata previa istruttoria ed estensione conformi alla vigente normativa in materia;

DETERMINA

Determinazione Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.

per le motivazioni indicate in premessa,

I – DI AFFIDARE ex art. 2 com. 1 lett. a) del D. Lgs. 76/2020 convertito con L. 120/20250 e s.m.i., alla Ditta Beckman Coulter S.r.l., la fornitura di *“test di tipizzazione linfocitaria finalizzata alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell’infezione da SARS-Cov.2”* (Cfr. Del. DG. n.409/2023), finalizzata alla ricerca scientifica *de qua*, secondo la configurazione di offerta e per l’importo complessivo di € 12.480,00 IVA esclusa, al 22%, così dettagliato:

Descrizione prodotto	Unità di misura	Quantità	Prezzo di listino	% di sconto praticato sul prezzo di listino	Prezzo unitario offerto	Importo totale prodotto IVA ESCLUSA 22%
Duraclone IM B Cell Tube	25 test	4	€ 2.051,00	% 35,64	€1.320,00	€ 5.280,00
Duraclone IM T Cell subsets Tube	25 test	4	€ 2.793,00	% 35,55	€ 1.800,00	€ 7.200,00
Versalyse Lysing Solution	100 test	15	€ 222,40	% 100	-	-
Isoflow Sheath Fluid	10 litri	10	€ 61,70	% 100	-	-
Provette in Polipropilene	1000 pezzi	4	€ 38,50	% 100	-	-
						TOTALE IVA ESCLUSA
						€12.480,00

II - DI IMPUTARE la spesa complessiva pari ad € 15.225,60,00 Iva inclusa al 22%, sul conto economico n. 5010105010 *“Dispositivi medico-diagnostico in vitro”* - bilancio 2023;

III - NOTIFICARE copia del presente provvedimento alla Ditta Beckman Coulter S.r.l.;

IV - PREVEDERE la clausola di recesso, ai sensi del combinato disposto dagli artt. 92 e 100 del D.Lgs. 159/2011 e s.m.i., qualora vengano accertati elementi relativi a tentativi di infiltrazione mafiosa;

V- NOMINARE Direttore dell’esecuzione del contratto il Direttore della U.O.C. Immunoematologia e Centro Trasfusionale, Dott.ssa Anna Sonia Raimondi;

VI - TRASMETTERE copia del medesimo provvedimento, ai sensi di legge, al Collegio Sindacale ed altresì alle UU.OO.CC. Gestione Economico – Finanziaria, Farmacia Ospedaliera, U.O.C.

Determinazione Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO"
CASERTA

Immunoematologia e Centro Trasfusionale ed al Direttore del Dipartimento Servizi Sanitari per gli adempimenti di rispettiva competenza.

L'estensore
Dott.ssa Agnese Basilicata

**UOC Provveditorato ed Economato
Il Direttore**

ATTESTAZIONE DI VERIFICA E REGISTRAZIONE CONTABILE
(per le proposte che determinano un costo per l'AORN – VEDI ALLEGATO)

Determinazione Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO"
CASERTA

Determinazione Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.

08/05/2023 16.34-20230014008

ALLEGATO 1



REGIONE CAMPANIA
Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale e di Alta Specializzazione
Sant'Anna e San Sebastiano
CASERTA

Alla UOC Provveditorato

Direttore U.O.C.

Dott.ssa Sonia Anna Raimondi

Tel. +39 0823232046

Mail :

immunoematologia@ospedale.caserta.it

U.O.S. Produzione emocomponenti

Dott. Pasquale Amato

Tel 0823 232048

I.P.A.S. Validazione Biologica

emocomponenti C.Q.B.

Dott.ssa Fabrizia Massa D'Elia

Tel 0823 232333

Dirigenti Medici

Dott.ssa Carmela Cafasso

Dott.ssa Antonietta Incarnato

Dott. Antonio Ragosta

Dott.ssa Caterina Rocco

Dott.ssa Rosa Romano

Tel 0823 232602

Dirigenti Biologi

Dott. Vincenzo Altomonte

Dott.ssa Ilaria Cimmino

Dott.ssa Caterina Pascariello

Dott.ssa Paola Perrotta

Dott. Francesco Spera

Tel 0823 232049

Coordinatore Tecnico

Dott. Vincenzo Telesco

Tel 0823 232045

Oggetto: richiesta test ditta Beckman per ricerca scientifica

Facendo seguito alla delibera 409 del 05/05/2023 per l'esecuzione di test di tipizzazione linfocitaria finalizzata alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell'infezione da SARS-Cov.2 con la AOU L. Vanvitelli; avendo la AOU Vanvitelli già accreditato a questa AORN euro 28.000 finalizzati alla consulenza del personale e all'acquisto dei reagenti (si allega); considerando che i test da eseguire per le sottopopolazioni linfocitarie sono forniti dalla ditta Beckman Coulter con contratto n°4600074883; voglia la S.V. voler richiedere alla ditta Beckman Coulter offerta economica per i seguenti test finalizzati alla ricerca scientifica:

Duraclone IM B Cell (25 test) 4 Confezioni

Duraclone IM T Cell (25 test) 4 Confezioni

Versalyse (100 test) 15 Confezioni

Soluzione Elettrolitica non fluorescente 10 Confezioni

Provette PP Citometria 12X 75 mm 15 Confezioni

Caserta, 08/05/2023

Il Direttore
A.O.R.N. SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO
CASERTA
U.O.C. di Immunoematologia e Centro
Trasfusionale
Direttore Dott.ssa Sonia Anna Raimondi

A.O.R.N. Sant'Anna e San Sebastiano - Caserta
Dipartimento dei Servizi Sanitari
Direttore: Dott. Paolo D'Andrea
BL 1646

ALLEGATO 2

Contratto : 4600074883 Validità dal 11.11.2021 al 01.11.2024 AOF0535
Tipo : ZWDA Cont. Diretti ASL/AO **Val.Prev.:** 256.710,00 **Importo totale**
Fornitore : 102350 BECKMAN COULTER S.R.L. **attivo :** 138.238,20
CIG : 7857762E52 **Ordinato :** 1.659,20
Impegno di Spesa : Num : del :
CdC responsabile : FCDR0207 UOC FARMACIA
CdC ricevente :
Mag. Ricevente :

CLM / Prodotto	Codice SIAC	Descrizione Articolo	UM	Quantità	Prezzo Unit	Sc %	IVA %
B92442	446567	CD105-PE 50 test	CFZ	0,000	170,00000		22
Pos: 1490	Importo	0,00 :	Qtà Ordinata :	1,000	Valore Ordinato Euro:		414,80
B12935	375653	CD23 CFZ 50TEST	CFZ	0,000	170,00000		22
Pos: 2480	Importo	0,00 :	Qtà Ordinata :	3,000	Valore Ordinato Euro:		829,60
B06025	728942	CD64-PC7	CFZ	0,000	170,00000		22
Pos: 2620	Importo	0,00 :	Qtà Ordinata :	1,000	Valore Ordinato Euro:		414,80

A.O.C. UOC: Affari Generali - Ufficio Protocollo Generale
Protocollo: 0014120/U Data: 09/05/2023 12:51
Ufficio: UFFICIO PROTOCOLLO
Classifica:



Spett.le Ditta Beckman Coulter
beckmancoulter@pec.beckman.it

OGGETTO: Richiesta test ditta Beckman per ricerca scientifica

Quest'AORN ha necessità di approvvigionarsi dei prodotti sottoelencati per l'esecuzione di test di tipizzazione linfocitaria finalizzata alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell'infezione SARS-Cov.2, con la AOU L. Vanvitelli. Pertanto si invita Codesta Spett.le Ditta, aggiudicataria ex. Del. del D.G. n. 86/20 della fornitura in "noleggio triennale di un citofluorimetro con somministrazione del materiale di consumo, occorrente al servizio trasfusionale" e n. 306/21, a voler formulare e a far pervenire con la massima urgenza all'indirizzo pec provveditorato@ospedalecasertapec.it, scheda tecnica, offerta economica, percentuale di sconto applicata e prezzo finale offerto per la fornitura urgente di seguito indicata:

- n. 4 CFZ (25 test) Duraclone IM B Cell
- n. 4 CFZ (25 test) Duraclone IM T Cell
- n. 15 CFZ (100 test) Versalyse
- n. 10 CFZ Soluzione Elettrolitica non fluorescente
- n. 15 CFZ Provette PP Citometria 12x75 mm

Le condizioni di fornitura sono le seguenti:

Luogo di consegna:

U.O.C. Farmacia AORN "S. ANNA E S. SEBASTIANO" via G. La Pira, Caserta.

Nella bolla di consegna, debitamente datata e numerata, secondo le vigenti disposizioni di legge in materia, dovrà essere indicato il numero del buono d'ordine, oltre alla descrizione del prodotto, la quantità, ecc. La ditta effettuerà le consegne a proprio rischio e con carico delle spese di qualsiasi natura.

Cessione dei crediti, cessione del contratto e subappalto

La cessione dei crediti derivanti dal presente contratto è soggetta alle disposizioni di cui all'art.106 del D.lgs. n.50/2016. In particolare, le cessioni dei crediti devono essere stipulate con atto pubblico o scrittura privata autenticata ed essere notificate alla stazione appaltante. Le stesse diventano efficaci ed opponibili alla stazione appaltante decorsi 45 giorni dalla notifica qualora non vengano rifiutate con apposita comunicazione.

È fatto divieto alla ditta aggiudicataria di cedere a terzi, in tutto o in parte, l'oggetto del contratto, pena l'immediata risoluzione dello stesso nonché il risarcimento di ogni conseguente danno. Non è ammesso il subappalto.

Fatturazione:

Si comunica che a far data dal 31 Marzo 2015 l'Azienda Ospedaliera "Sant'Anna e San Sebastiano" di Caserta accetterà le fatture solo nel formato elettronico secondo l'allegato A del DM n.55/2013 e s.m.e.i. Le fatture elettroniche indirizzate alla presente Azienda Ospedaliera devono contenere i seguenti elementi specifici (come riportato sul sito: www.indicepa.gov.it):

Denominazione Ente:	Azienda Ospedaliera Sant'Anna e San Sebastiano di Caserta
Codice IPA:	aosa_061
Codice Univoco Ufficio:	551B2G
Nome dell'Ufficio:	FATTURAZIONE
Cod. fisc. del Servizio di F.E.:	02201130610
Partita Iva :	02201130610

Pagamento:

il pagamento avverrà nei 60 (sessanta) giorni dalla data di ricezione delle fatture da parte del Servizio Economico-Finanziario dell'AORN, dopo l'acquisizione del visto di regolare esecuzione del Responsabile della UO di destinazione.

Ai sensi e per gli effetti dell'art. 3) della legge 136 del 2010 e s.m.i. il fornitore deve assumere gli obblighi di tracciabilità dei flussi finanziari; pertanto, per non incorrere nella risoluzione del contratto, ai sensi dell'art. 3) comma 9 bis della suddetta legge, deve comunicare mediante dichiarazione sostitutiva dell'atto di notorietà - art. 47 DPR 445/2000 - gli estremi del c/c postale o bancario dedicato su cui effettuare i pagamenti, unitamente alle generalità ed al codice fiscale dei soggetti delegati ad operare sul conto, allegando fotocopia dei documenti di riconoscimento.

Il fornitore prende atto che il mancato utilizzo del conto corrente postale o bancario, ovvero degli altri strumenti che assicurino la tracciabilità dei movimenti finanziari, costituisce causa di risoluzione del contratto ai sensi dell'art. 3), comma 9 bis della legge 136/2010 e s.m.i.

L'impresa affidataria accetta, inoltre, tutte le clausole di cui al "Protocollo di Legalità" di cui la medesima società ha preso visione ed ha scaricato sul sito www.ospedale.caserta.it ad eccezione delle previsioni di cui all'art.2 co.2 punti h) e i) e di quelle di cui all'art.7 co.1 e all'art.8 co.1 clausola 7) e 8). (vedi delibere AORN n.6 del 31.01.14 e n.357 del 21.11.14)

Controversie

Per la soluzione di controversie eventualmente insorte nel corso dell'esecuzione della fornitura, sarà inizialmente tentata la composizione in via amministrativa. In caso di perdurante disaccordo la risoluzione del contenzioso sarà affidata al competente Tribunale di Santa Maria Capua Vetere.



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE
E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO" DI CASERTA

Norme comuni

Per quanto non previsto espressamente dalla presente, si rinvia alla disciplina comunitaria e nazionale vigente in materia di contratti pubblici.

Si precisa che con la presente lettera questa Azienda non assume alcun impegno contrattuale e, di conseguenza, può procedere alla revoca della medesima in qualsiasi momento senza ulteriore comunicazione.

*Il Direttore U.O.C. Provveditorato ed Economato
Dot.ssa Teresa Capobianco*

RE: Richiesta test Beckman**ALLEGATO 4**

Da lifesciences@pec.beckman.it <lifesciences@pec.beckman.it>
A provveditorato@ospedalecasertapec.it <provveditorato@ospedalecasertapec.it>
Data venerdì 12 maggio 2023 - 15:05

Spett.le AORN di Caserta,

Con riferimento alla Vs richiesta del 09/05/2023 si inoltrano l'offerta firmata digitalmente dal Ns Procuratore Speciale, la Dott.ssa Adriana Cori, e le schede tecniche dei prodotti offerti.
Cordiali saluti,

Federica Fiore



Federica Fiore | Sales Admin Specialist – Tender & MarComm

a | Beckman Coulter S.r.l. Via Roma, 108 - Palazzo F/1 20051 Cassina De' Pecchi (MI)
ITALY
p | +39 348 8952233
e | ffiore@beckman.com w | beckman.com

Confidential - Company Proprietary

From: provveditorato@ospedalecasertapec.it <provveditorato@ospedalecasertapec.it>
Sent: Tuesday, May 9, 2023 1:31 PM
To: Bec, beckmancoulter@pec.beckman.it <beckmancoulter@pec.beckman.it>
Subject: Richiesta test Beckman

Si trasmette in allegato richiesta di offerta.
Restasi in attesa di riscontro.

UOC Provveditorato ed Economato
AORN San't Anna e San Sebastiano di Caserta

*U.O.C. Provveditorato ed Economato
AORN Sant'Anna e San Sebastiano – Caserta*

Via Palasciano 81100 – Caserta - Tel. 0823/232462

e-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it

PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it

Please be advised that this email may contain confidential information. If you are not the intended recipient, please notify us by email by replying to the sender and delete this message. The sender disclaims that the content of this email constitutes an offer to enter into, or the acceptance of, any agreement; provided that the foregoing does not invalidate the binding effect of any digital or other electronic reproduction of a manual signature that is included in any attachment.

Schema di OFFERTA ECONOMICA_signed.pdf

B53328_ST.pdf

8546859_ST.pdf

A09777_ST_IT.pdf

B31974 provette.pdf

B53318_ST.pdf

DuraClone IM T cell subsets Tube

Cod. B53328 – 25 test

RUO: for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. (Solo per uso in ricerca. Non per diagnosi).

	Specifiche del componente 1	Specifiche del componente 2	Specifiche del componente 3	Specifiche del componente 4	Specifiche del componente 5	Specifiche del componente 6	Specifiche del componente 7	Specifiche del componente 8
Specificità	CD45RA	CD197(CCR7)	CD28	CD279(PD1)	CD27	CD4	CD8	CD3
Clone	(2H4)	G043H7	CD28.2	PD1.3.5	1A4.CD27	13B8.2	B9.11	J33UCHT-1
Immunogeno	Linfociti T derivati da Aotus Trivirgatus	Cellule trasfettate con CCR7	Linea cellulare murina trasfettata	PD1-FcIg	Cellule T umane stimulate con PHA	Timociti umani	Clone T umano citotossico HLA A2	Linea cellulare T + IL2
Isotipo	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Specie	Topo	Topo	Topo	Topo	Topo	Topo	Topo	topo
Fonte	Media condizionati	Ascite						
Purificazione	Cromatografia di affinità							
Fluorocromo	Isotiocianato di fluoresceina (FITC)	R-Ficoeritrina (PE)	R-Ficoeritrina-Texas Red-X (ECD)	R-Ficoeritrina-Cianina 5.5 (PC5.5)	R-Ficoeritrina-Cianina 7 (PC7)	Allofocianina (APC)	Alexa Fluor 700	Allofocianina-Alexa Fluor 750 (APC-A750)
λ Eccitazione	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633 nm	633 nm
Picco di emissione	523 nm	575 nm	613 nm	692 nm	760 nm	650 nm	720 nm	767 nm

	Specifiche del componente 9	Specifiche del componente 10
Specificità	CD57	CD45
Clone	NC1	J33
Immunogeno	Cellule del ganglio ciliare di quaglia	Linea cellulare Laz 221
Isotipo	IgGM	IgG1
Specie	Topo	Topo
Fonte	Ascite	
Purificazione	Cromatografia di affinità	
Fluorocromo	Pacific Blue	Krome Orange
A Eccitazione	405 nm	405 nm
Picco di emissione	455 nm	528 nm

BACKGROUND

Quando si studia la risposta immunitaria, l'immunità mediata dalle cellule T è il componente centrale^{1,2}. Dopo la loro maturazione nel timo, le cellule T circolano nel sangue e nel sistema linfatico come cellule T "naive" esprimendo gli antigeni del "homing" linfonodale quali CD197/CCR7. A seguito dell'esposizione ad antigeni estranei attraverso l'incontro con le cellule specializzate presentanti l'antigene in tessuti linfoidi secondari, le cellule T diventano cellule effettrici antigene-specifiche in associazione con la perdita dell'espressione di CD27 e CD28. Insieme alle cellule effettrici sono generate cellule T di memoria centrale a lunga durata (CD45RA-CCR7+) e cellule T memoria effettrici (CD45RA-CCR7-) per realizzare e preservare l'abilità di una rapida risposta immunitaria antigene specifica. Gli stadi terminali effettori della differenziazione delle cellule T sono indicati dalla sovra-

regolazione dell'espressione CD57 (fenotipo effettore) e CD279/PD-1 (molecola co-inibitoria, fenotipo esausto).

APPLICAZIONI

I pannelli DuraClone IM sono utilizzati per identificare le sottopopolazioni cellulari in campioni di sangue intero umano con un citometro a flusso.

IM T cell subsets Tube è una miscela di 10 anticorpi monoclonali a 10 colori che consente di identificare i marcatori extracellulari comuni di differenti sottogruppi cellulari presenti in campioni di sangue intero.

Questo reagente è destinato all'uso su un citometro a flusso con tre laser:

- un laser a 488 nm rilevatori dedicati al rilevamento dello scatter della luce (forward e side) e dell'emissione di fluorescenza nei seguenti intervalli: 504-545 nm, 560-600 nm, 605-635 nm, 680-710 nm.
- Un laser a 638 nm con rilevatori dedicati al rilevamento dell'emissione di fluorescenza nei seguenti intervalli: 650-670 nm, 715-735 nm e >755 nm.
- Un laser a 405 nm con rilevatori dedicati al rilevamento dell'emissione di fluorescenza nei seguenti intervalli: 430-470 nm e 530-570 nm.

PRINCIPIO

Il test si basa sulla capacità di specifici anticorpi monoclonali di legarsi ai determinanti antigenici espressi dai linfociti. La marcatura specifica delle popolazioni di interesse si effettua dispensando e incubando il campione nel IM T cell subsets tube. Gli eritrociti sono poi rimossi tramite lisi e i leucociti, che non sono influenzati da questo processo di lisi, sono analizzati in citometria a flusso. La citometria a flusso consente l'identificazione delle popolazioni cellulari di interesse sulla base della rilevazione della dispersione della luce in avanti e laterale così come la luce emessa dagli antigeni cellulari marcati con fluorescenza. L'identificazione delle popolazioni è facilitata dal posizionamento di ciascuna cellula all'interno di coordinate collegate all'amplificazione dello scatter e/o dei segnali di fluorescenza. Le informazioni provenienti da diversi grafici possono essere combinate in riferimento al gating. La fluorescenza dovuta a marcatura specifica degli antigeni è discriminata verso il rumore di fondo o l'auto-fluorescenza delle cellule con l'aiuto delle popolazioni cellulari di controllo interne o esterne. I risultati sono tipicamente espressi come percentuale di eventi positivi nel gate.

CONTENUTO DEL KIT

DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 test, RUO contiene:

- 25 test di DuraClone IM T cell subsets (cioè una singola provetta è un singolo test)
- 3 kit di compensazione, ciascuno contenente dieci provette, ciascuna a singolo colore, cioè:
 - CD4-FITC
 - CD4-PE
 - CD28-ECD
 - PD1-PC5.5
 - CD27-PC7
 - CD4-APC
 - CD8-Alexa Fluor 700
 - CD3-APC-A750
 - CD4-PB
 - CD8-Krome Orange

AVVERTENZE

1. Non utilizzare il reagente o le provette di compensazione oltre la data di scadenza.
2. Non conservare le provette in frigorifero; non congelare/scongelerle le provette.
3. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente capaci di trasmettere infezioni e come tali maneggiati con attenzione (guanti protettivi, camici ed occhiali devono essere utilizzati quando si maneggiano campioni di sangue).
4. Le provette contenenti sangue e materiale monouso utilizzato per la manipolazione devono essere smaltite in contenitori ad hoc destinati all'incenerimento.
5. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce delle provette, specialmente durante l'incubazione dei campioni marcati con anticorpi fluorescenti o nel corso della lisi e dopo il processamento del campione, prima dell'uso.
6. Per l'aggiunta di campioni di sangue deve essere utilizzata una pipetta calibrata e la pipetta deve essere utilizzata secondo le istruzioni del produttore.

CONDIZIONI DI STOCCAGGIO

Conservare le provette reagente e di compensazione fra 20 e 30°C, in luogo asciutto e protette dall'esposizione alla luce diretta e dall'umidità. Per la data di scadenza fare riferimento all'etichetta del kit.

INDICI DI DETERIORAMENTO

Eventuali danni al pannello di provette possono essere indice di deterioramento del prodotto e, in tal caso, lo stesso non deve essere utilizzato. Si prega di contattare il distributore locale o potete contattare Beckman Coulter al seguente indirizzo e-mail: duraclone-support@beckman.com.

REQUISITI DELLO STRUMENTO

Questo reagente è ideato per essere utilizzato su un citofluorimetro in grado di rilevare forward e side scatter e compatibile con gli spettri di eccitazione ed emissione dei fluorocromi utilizzati nel reagente. Questo reagente è compatibile con *Navios.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

I campioni di sangue intero devono essere raccolti in provette dedicate contenenti anticoagulante. Seguire le indicazioni del produttore delle provette per il volume minimo di sangue che può essere raccolto. Il campione deve essere conservato fra 18 e 26°C.

MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Provette contenenti anticoagulante per la raccolta del sangue.

Pipette calibrate.

Miscelatore Vortex.

Liquido di trascinamento.

Biglie di calibrazione del citofluorimetro.

Fluorosfere Flow-Check Pro (cod. per Italia A63493). (Per la verifica dell'allineamento di Navios).

Fluorosfere Flow-Set Pro (cod. per Italia A63492). (Per la standardizzazione di Navios).

VersaLyse Solution (cod. A09777).

IOtest 3 Fixative Solution (cod. A07800) Siero fetale bovino.

Citofluorimetro.

PROCEDURA**PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

1. Aggiungere 100 µl di sangue intero fresco a ciascuna provetta contenente il reagente essiccato, miscelare al vortex ad alta velocità per 6-8 secondi e incubare per 15 minuti, al riparo dalla luce diretta, a 20-30°C.

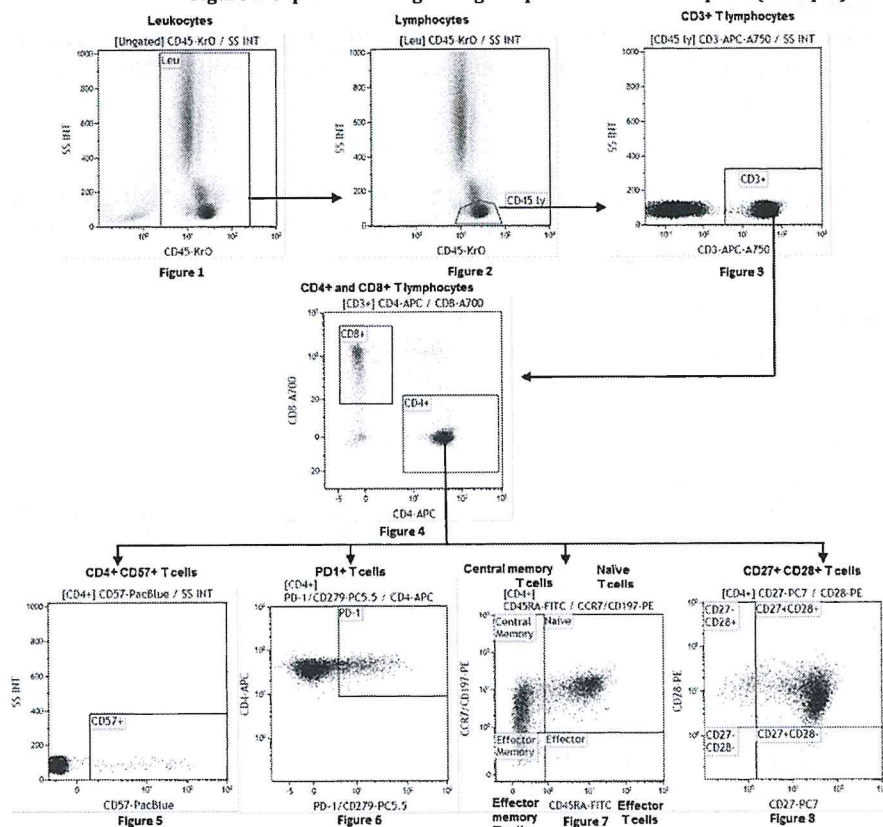
2. Aggiungere 2 ml di VersaLyse, miscelare al vortex ad alta velocità per 1-3 secondi e incubare le provette per 15 minuti, al riparo dalla luce, fra 20 e 30°C.
3. Centrifugare le provette a 200 x g per 5 minuti; aspirare il surnatante, picchiando delicatamente il pellet cellulare.
4. Eseguire un lavaggio per riportare in sospensione il pellet cellulare in 3 ml di PBS 1X e centrifugare le provette a 200 x g per 5 minuti; aspirare il surnatante, picchiando delicatamente il pellet cellulare e riportarlo in sospensione in 500 µl di PBS 1X contenente 0.8% di IOTest 3 Fixative Solution. Ora il campione è pronto per l'acquisizione.

SETTAGGIO DELLA COMPENSAZIONE

1. Marcare tutte le dieci provette a singolo colore del kit di compensazione fornito nel DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 test, RUO con sangue venoso secondo i passaggi 1-4 della procedura di preparazione del campione.
2. Per l'acquisizione dei campioni su Navios: l'AutoSetup Scheduler su Navios raggruppa applicazioni selezionate per il settaggio efficiente di comuni campioni di compensazione quando si schedulano applicazioni multiple e fornisce il rapporto del carosello caricato per facilitare il settaggio e il caricamento dei campioni per il QC giornaliero. Per il settaggio della compensazione utilizzando AutoSetup Scheduler, fare riferimento alla nota applicativa "Settaggio della compensazione per reagenti DuraClone ad elevato contenuto", scaricabile dal sito Beckman Coulter: www.duraclone.com.
3. Per gli utilizzatori di tutti gli altri citofluorimetri, si prega di seguire le procedure standard e le istruzioni del fabbricante la strumentazione per il settaggio della compensazione.

ANALISI DEI CAMPIONI (Esempio)

Figure 1-8: protocollo di gate seguito per l'analisi dei campioni (esempio)



1. Creare un appropriato protocollo di analisi per definire i gate delle popolazioni e una serie di istogrammi a due parametri per l'analisi delle specificità del reagente.
2. Impostare il discriminatore del parametro FS ad un livello abbastanza basso per assicurare che i linfociti non siano esclusi dall'acquisizione.
3. Impostare un diagramma di punti CD45-KrO vs SSC e impostare una regione per contenere i linfociti CD45⁺ (figura 1).
4. Impostare un diagramma di punti CD45-KrO vs SSC e applicare il gate dei leucociti. Disegnare una regione per delimitare i linfociti CD45⁺ (figura 2).
5. Impostare un diagramma di punti CD3-AA750 vs SSC e disegnare una regione per racchiudere le cellule T CD3⁺ (figura 3).
6. Impostare un diagramma di punti CD4-APC vs CD8-A700 e disegnare due regioni per racchiudere le cellule T CD4⁺ e CD8⁺ rispettivamente (figura 4).
7. Impostare quattro diagrammi di punti come di seguito, il gating sulle cellule T CD4⁺ o CD8⁺ può essere applicato a questi grafici:
 - a. Impostare un diagramma a punti CD57-Pacific Blue vs SSC e disegnare una regione per racchiudere le cellule CD57⁺ (figura 5).
 - b. Impostare un diagramma a punti PD1-PC5.5 vs SSC e disegnare una regione per racchiudere le cellule PD1⁺ (figura 6).
 - c. Impostare un diagramma a punti CD45RA-FITC vs CCR7-PE. Disegnare un quadrante per delineare quanto segue (figura 7):
 - le cellule di memoria centrale CCR7⁺CD45RA⁻,
 - le cellule T quiescenti (naïve) CCR7⁺CD45RA⁺,
 - le cellule T effettrici di memoria CCR7⁻CD45RA⁻,
 - le cellule T effettrici CCR7⁻CD45RA⁺.
 - d. Impostare un diagramma a punti CD28-ECD vs CD27-PC7 e disegnare un quadrante per delineare quanto segue (figura 8):
 - cellule CD27⁺CD28⁻,
 - cellule CD27⁺CD28⁺,
 - cellule CD27⁻CD28⁺,
 - cellule CD27⁻CD28⁻.
8. Impostare più diagrammi a punti, secondo necessità, e registrare la % di reclutamento em l'intensità media di fluorescenza (MFI) di tutte le popolazioni di interesse racchiuse nei gate.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

1. S. Vigano, M. Perreau, G. Pantaleo, and A. Harari. Positive and Negative Regulation of Cellular Immune Responses in Physiologic Conditions and Diseases. Clinical and Developmental Immunology. Volume 2012, Article ID 485781.
2. Frans P. Nijkamp, Michael J Parnham (eds.), Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition. Springer Basel AG.2011.

DISPONIBILITA' DEL PRODOTTO

DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 test, RUO. Cod. B53328.

MARCHI

Beckman Coulter, il logo stilizzato, Navios e VersaLyse sono marchi di Beckman Coulter, Inc. e registrati all'USPTO (United States Patent and Trademark Office). DuraClone, Flow-Check, Flow-Set, Pacific Blue e Krome Orange sono marchi di Beckman Coulter, Inc.

*Navios è marcato CE per uso diagnostico in vitro (IVD) a 10 colori.

Negli U.S.A. Navios si intende per uso come dispositivo IVD per immunofenotipizzazione con il software Navios tetra e i reagenti CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5



e CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5. Tutti gli altri usi sono solo per uso ricerca (RUO).

IOTest è un marchio di Immunotech S.A. ed è registrato nel USPTO.

Alexa Fluor 700 e Allofococianina Alexa Fluor 750 sono marchi di Molecular Probes, Inc.

Per informazioni aggiuntive o nel caso il prodotto ricevuto sia danneggiato, scrivere una e-mail al servizio clienti Beckman Coulter duraclone-support@beckman.com o contattare il rappresentante locale Beckman Coulter.

 Beckman Coulter India Pvt. Ltd.
50-B, II Phase, Peenya Industrial Area
Peenya, Bangalore 560058, India

Stampato in India

©2014 Beckman Coulter, Inc.
Tutti i diritti riservati

Revisione 1.0, ottobre 2014
▪ Versione iniziale

Traduzione di cortesia a cura del Marketing di Beckman Coulter Italia

DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 tests, RUO

REF B53328 – 25 tests

IFU- B53328-1.0



	Specifications of Constituent 1	Specifications of Constituent 2	Specifications of Constituent 3	Specifications of Constituent 4	Specifications of Constituent 5	Specifications of Constituent 6	Specifications of Constituent 7	Specifications of Constituent 8	Specifications of Constituent 9	Specification of Constituent 10
Specificity	CD45RA	CD197 (CCR7)	CD28	CD279 (PD1)	CD27	CD4	CD8	CD3	CD57	CD45
Clone	2H4	G043H7	CD28.2	PD1.3.5	1A4, CD27	13B8.2	B9.11	UCHT-1	NC1	J33
Immunogen	T lymphocyte line from Aotus trivirgatus	CCR7-transfected cells	Transfected murine cell line	PD1-FcIg	PHA-stimulated human T cells	Human thymocytes	Cytotoxic human T clone HLA A2	T cell line + IL2	Cells from quail ciliary ganglia	Laz 221 cell line
Isotype	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgM	IgG1
Species	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse
Source	Conditioned Media	Ascites fluid								
Purification	Affinity chromatography									
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X(ECD)	R Phycoerythrin-Cyanine 5.5 (PC5.5)	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Allophycocyanin(APC)	Alexa Fluor 700 (A700)	Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Pacific Blue	Krome Orange
λ Excitation	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633nm	633 nm	405 nm	405 nm
Emission peak	523 nm	575 nm	613 nm	692 nm	760 nm	650 nm	720nm	767 nm	455 nm	528 nm

For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.

BACKGROUND

When studying the immune response, T cell-mediated immunity is the central component ^{1,2}. After their maturation in the thymus, T cells circulate in blood and in the lymphatic system as naive T cells expressing lymph node homing antigens such as CD197/ CCR7. Upon exposure to foreign antigens through encounter with specialized, antigen-presenting cells in secondary lymphoid tissues, T cells become antigen-specific effector cells associated with loss of CD27 and CD28 expression. Along with the effector cells, long-living central memory (CD45RA-CCR7+) and effector memory T cells (CD45RA-CCR7-) are generated to achieve and preserve the ability of rapid antigen-specific immune response. Terminal effector stages of T cell differentiation are indicated by up-regulation of CD57 (effector phenotype) and CD279/PD-1 (co-inhibitory molecule, exhausted phenotype) expression.

APPLICATION

The DuraClone IM panels are used to identify cell subpopulations in human whole blood samples by flow cytometry.

The IM T cell subsets Tube is a 10-color, 10-monoclonal antibody reagent that allows the identification of common extracellular markers of different cell subsets, present in whole blood specimens.

This reagent is intended to be used on a flow cytometer with three lasers:

- A 488 nm laser with detectors dedicated to detection of light scatter (forward and side) and fluorescence emission in the following ranges: 504 – 545 nm, 560 – 600 nm, 605 – 635 nm, 680 – 710 nm and >755nm.
- A 638 nm laser with detectors dedicated to detection of fluorescence emission in the following ranges: 650 – 670 nm, 715 – 735nm and >755 nm.
- A 405 nm laser with detectors dedicated to detection of fluorescence emission in the following ranges: 430 – 470 nm and 530 – 570nm.

PRINCIPLE

This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by lymphocytes. Specific staining of the populations of interest is performed by pipetting and incubating the sample in the IM T cell subsets tube. The erythrocytes are then removed by lysis and the leukocytes, which are unaffected by this process of lysis, are analyzed by flow cytometry. Flow cytometry allows for the identification of cellular populations of interest based on the detection of forward and sideward scattering light as well as light

emission from fluorescently labeled cellular antigens or compartments. The identification of populations is facilitated by the plotting of each cell into coordinates related to the amplified scatter and/or fluorescence signals. Information from several plots can be combined referred to as gating. Fluorescence due to specific labeling of antigens is discriminated against background or autofluorescence of the cells with the help of internal or external cellular control populations. The results are typically expressed as gated percentage of positive events.

KIT BOX CONTENTS

DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 tests, RUO contains the following:

- 25 tests of the DuraClone IM T cell subsets Tube (i.e. a single tube is a single test)
- 3 Compensation Kits, each kit containing ten tubes, each of a single color; i.e.
 - CD4-FITC
 - CD4-PE
 - CD28-ECD
 - PD1-PC5.5
 - CD27-PC7
 - CD4-APC
 - CD8-A700
 - CD3-APC-A750
 - CD4-Pacific Blue
 - CD8-Krome Orange

STATEMENT OF WARNINGS

1. Do not use the reagent or compensation tubes beyond the expiry date.
2. Do not store the tubes in the refrigerator; do not freeze/thaw the tubes.
3. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (protective gloves, gowns and goggles must be used while handling blood samples).
4. Tubes containing blood and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.
5. Minimize the exposure of light to the tubes, especially during incubation of sample stained with fluorescent antibodies or during lysis and after processing of sample, before use.
6. A calibrated pipette should be used for the addition of blood samples and the pipette should be operated according to the manufacturer's instructions.

STORAGE CONDITIONS

Store the reagent tubes and compensation kit tubes between 20 and 30°C, in a dry place and protect it from the direct exposure to light and moisture. Refer to the kit label for the date of expiry of the reagent

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any damage to the panel tube may indicate product deterioration and the product should not be used. Please contact your local distributor or you can contact Beckman Coulter at the following email address: duraclone-support@beckman.com

INSTRUMENT REQUIREMENTS

This reagent is designed to be used on a flow cytometer capable of detecting forward and side scatter, and compatible with the emission spectra of the fluorochromes used in the reagent. This reagent is compatible with *Navios.

SPECIMEN COLLECTION

The venous blood sample should be collected in a blood collection tube containing anticoagulant. Follow the collection tube manufacturer's guidelines for the minimum volume of blood to be collected. The sample must be stored between 18°C and 26°C.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Blood collection tube containing anticoagulant
- Calibrated pipettes
- Vortex mixer
- Sheath fluid
- Flow cytometer calibration beads
- Flow-Check ProFluorospheres (REF. A69183) (For Navios alignment verification)
- Flow-Set ProFluorospheres (REF. A69184) (For Navios standardization)
- VersaLyse Solution (REF. A09777)
- IOTest 3 Fixative Solution (REF. A07800)
- Flow cytometer

PROCEDURE SAMPLE PREPARATION

1. Add 100µL of fresh whole blood to the dried reagent tube, vortex at high speed for 6-8 seconds and incubate the tube for 15 minutes, protected from the direct exposure to light between 20 and 30°C.
2. Add 2mL of VersaLyse, vortex the tube at high speed for 1-3 seconds and incubate the tube for 15 minutes protected from the direct exposure to light, between 20 and 30°C.
3. Centrifuge the tube at 200 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet.
4. Perform a wash step by re-suspending the cell pellet in 3mL 1X PBS and centrifuging the tube at 200 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet and re-suspend the cell pellet in 500µL of 1X PBS containing 0.8% IOTest 3 Fixative Solution. The sample is now ready for acquisition.

COMPENSATION SETUP

1. Stain all the ten single color tubes from a single pouch of the Compensation Kit provided in the IM DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 tests, RUO with venous blood by following steps 1-4 in the sample preparation procedure.

2. For sample acquisition on Navios: The AutoSetup Scheduler on the Navios groups the selected applications for efficient set up in sampling from common compensation samples when scheduling multiple applications and provides the carousel load report to facilitate setting up and loading samples for daily QC. For setting up compensation using

AutoSetup Scheduler, refer to the Application Note "Compensation Setup for High Content DuraClone reagents", downloadable from the Beckman Coulter website: www.duracell.com

3. For all other flow cytometer users, please follow standard procedures and instrument manufacturer instructions for compensation setup.

SAMPLE ANALYSIS (Example)

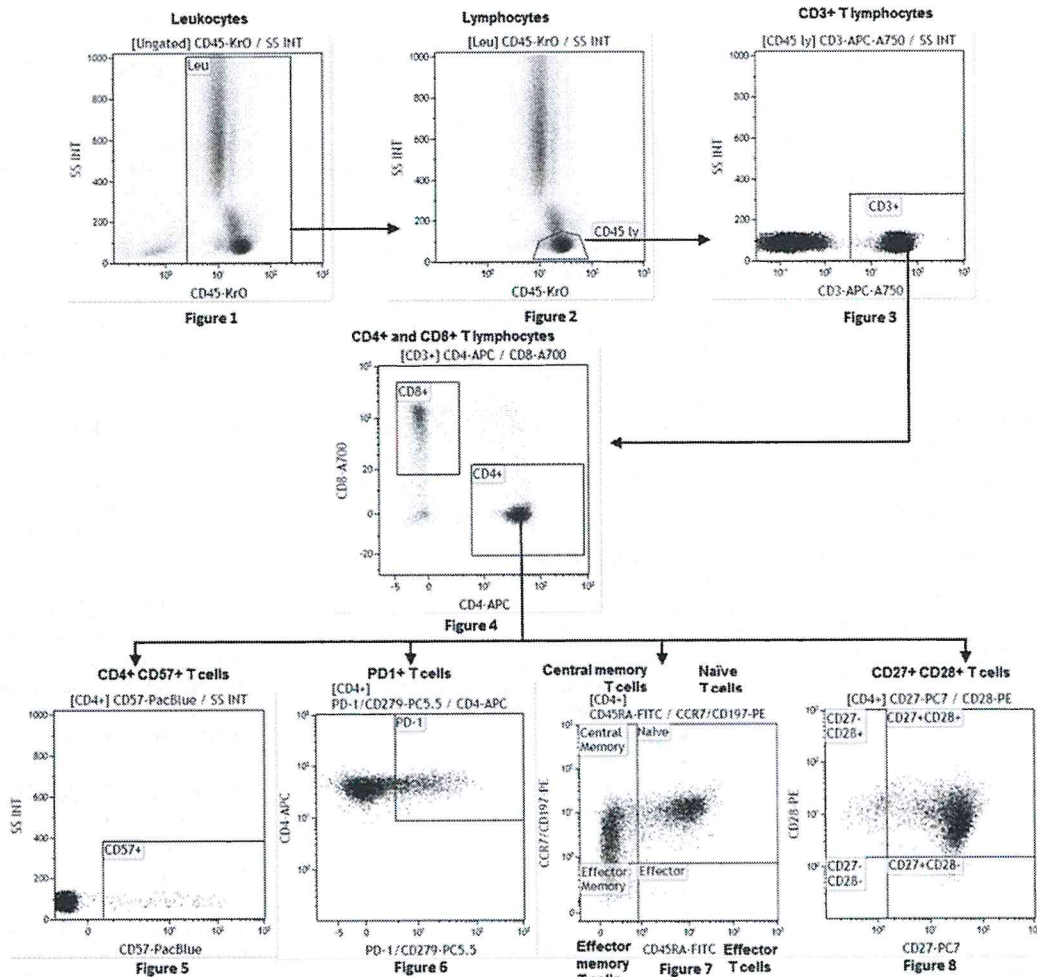


Figure1-8: Gating protocol followed for sample analysis (example)

1. Create an appropriate analysis protocol to define the population gates and the series of dual parameter plots for analysis of the reagent specificities
2. Set the discriminator on the FS parameter to a value low enough to assure the lymphocytes are not excluded from the acquisition.
3. Create a CD45-KrO (Krome Orange) vs. SSC dot plot and create a region to encompass the CD45+ leukocytes (Figure1).
4. Create a CD45-KrO vs. SSC dot plot and apply the Leukocyte gate. Create a region to encompass the CD45+ lymphocytes (Figure2).
5. Create a CD3-AA750 vs. SSC dot plot and draw a region to gate the CD3+ T cells (Figure3).
6. Create a CD4-APC vs. C8-A700 dot plot and draw two regions to gate the CD4+ T cells and CD8+ T cells respectively (Figure 4).
7. Create four dot plots as follows, gating either on CD4+ or on CD8+ T cells may be applied to these plots:
 - a. Create a CD57-PacBlue (Pacific Blue) vs. SSC dot plot and draw a region to encompass the CD57+ cells (Figure5).
 - b. Create a PD1-PC5.5 vs. SSC dot plot and draw a region to encompass the PD-1+ cells (Figure 6).
 - c. Create a CD45RA-FITC vs. CCR7-PE dot plot. Draw a quadrant to delineate the following (Figure7):-
The CCR7+ CD45RA- Central memory cells.
The CCR7+ CD45RA+ Naïve T cells,
The CCR7-CD45RA- Effector memory T cells
The CCR7-CD45RA+ Effector T cells
 - d. Create a CD28-ECD vs. CD27-PC7 dot plot and draw a quadrant to delineate the following (Figure8):-
CD27+ CD28- cells
CD27+ CD28+ cells
CD27-CD28+ cells
CD27-CD28- cells
8. Create more plots as needed and record the % recruitment and the mean fluorescence intensity (MFI) of all gated cell populations of interest.

REFERENCES

1. S. Vigano, M. Perreau, G. Pantaleo, and A. Harari. Positive and Negative Regulation of Cellular Immune Responses in Physiologic Conditions and Diseases. *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2012, Article ID 485781.
2. Frans P. Nijkamp, Michael J Parnham (eds.), *Principles of Immunopharmacology*. 3rd revised and extended edition. Springer Basel AG.2011.

PRODUCT AVAILABILITY

DuraClone IM T cell subsets Tube, 25 tests, RUO.

REF B53328

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, Navios and VersaLyse are trademarks of Beckman Coulter, Inc., and are registered in the USPTO. DuraClone, Flow-Check, Flow-Set, Pacific Blue and Krome Orange are trademarks of Beckman Coulter, Inc.

*Navios is CE marked for 10-color in vitro diagnostic (IVD) use. In the U.S.A., Navios is intended for use as an IVD device for immunophenotyping with Navios tetra software and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 reagents. All other uses are for research use only (RUO).

IOtest is a trademark of Immunotech S.A. and is registered in the USPTO.

Alexa Fluor 700 and Allophycocyanin Alexa Fluor 750 are trademarks of Molecular Probes, Inc.

For additional information, or if a damaged product is received, email Beckman Coulter Customer Service at duraclone-support@beckman.com or contact your local Beckman Coulter Representative.



Beckman Coulter India Pvt. Ltd.
50-B, II Phase, Peenya Industrial Area
Peenya, Bangalore 560058, India

Printed in India

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision 1.0, October 2014

■ Initial Release

IsoFlow Sheath Fluid

REF 8546859 – 1 x 10 l
REF 8547008 – 4 x 1,8 l

PN 624877-DJ



IVD

USO PREVISTO

Soluzione elettrolitica equilibrata, non fluorescente e priva di azide, da utilizzarsi sui citofluorimetri COULTER con applicazioni di scatter e fluorescenza.

SOMMARIO

Nei citofluorimetri le cellule vengono guidate in fila indiana attraverso un raggio laser utilizzando il processo di focalizzazione idrodinamica. Con questa procedura le cellule vengono focalizzate in un flusso di diluente che, attraverso una guaina pressurizzata, transita nella cella a flusso dove vengono eseguite le analisi. IsoFlow Sheath Fluid è prodotto per background a basse concentrazioni particellari e di fluorescenza, che garantisce un superiore grado di misurazione del rapporto segnale-rumore durante le analisi.

PRINCIPI ANALITICI

Il diluente è un composto chimico formato dai seguenti elementi:

- Cloruro di sodio, che consente al diluente di agire come elettrolita capace di condurre corrente elettrica in un analizzatore elettronico e che, insieme ai sali di fosfato, agisce da tampone per stabilire l'equilibrio del pH.

COMPONENTI REATTIVI

Cloruro di sodio	7,93 g/l
EDTA disodico	0,38 g/l
Cloruro di potassio	0,40 g/l
Fosfato monosodico	0,19 g/l
Fosfato disodico	1,95 g/l
Fluoruro di sodio	0,30 g/l

PROCEDURA

Monitorare periodicamente le prestazioni del sistema, come specificato nelle procedure passo passo descritte nelle istruzioni dello strumento.

CONSERVAZIONE, STABILITÀ E SCARTO

Usare alle temperature indicate nei manuali dei prodotti dello strumento. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza o se il prodotto risulta essere contaminato. ELIMINARE IL PRODOTTO SE CONGELATO. Scartare i rifiuti, il prodotto rimasto inutilizzato e le confezioni contaminate osservando le norme governative nazionali e locali.

AVVERTENZA

SDS La Scheda dei dati di sicurezza è disponibile all'indirizzo beckman.com/techdocs.

Non inalare e/o ingerire. Evitare il contatto oculare e cutaneo. In caso di contatto oculare o cutaneo, lavare la zona interessata con acqua abbondante per almeno 15 minuti.

NON RIUTILIZZARE IL CONTENITORE.

PREPARAZIONE

Non è necessaria alcuna preparazione. Eseguire un ciclo di Prime dopo aver aggiunto i reagenti, prima di utilizzare lo strumento.

DISPONIBILITÀ DEL PRODOTTO

IsoFlow Sheath Fluid

REF 8546859 – 1 x 10 l

REF 8547008 – 4 x 1,8 l

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

Il Glossary of Symbols (Glossario dei simboli) è disponibile sul sito beckman.com/techdocs (PN C05838).



Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821 U.S.A.
www.beckman.com

EC REP

Beckman Coulter Eurocenter S.A.
22, rue Juste-Olivier
Case Postale 1044
CH - 1260 Nyon 1, Switzerland
Tel: +41 (0) 22 365 36 11

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Tutti i diritti riservati.

Cronologia delle revisioni

Revisione DG, 09/2017

Modifiche apportate a:

- Integrare nuove lingue

Revisione DH, 07/2018

Modifiche apportate a:

- Integrare nuove lingue
- Russo

Revisione DJ, 10/2018

Modifiche apportate a:

- Integrare nuove lingue





VersaLyse

Lysing Solution

REF

1 mL / test, A09777
100 tests; 100 mL

TABLE OF CONTENTS

English	2
Français (FR)	7
Deutsch (DE)	12
Italiano (IT)	18
Español (ES)	23
Português Portugal (PT-PT)	28
Dansk (DA)	33
Svenska (SV)	38
Norsk (NO)	43
Ελληνικά (EL)	48
日本語 (JP)	54
Lietuviškai (LT)	59
Magyar (HU)	64
Polski (PL)	69
Čeština (CZ)	74
Slovenčina (SK)	79
한국어 (KO)	84
Türkçe (TR)	89
Русский (RU)	94
eesti keel (ET)	100
Hrvatski (HR)	105
Български (BG)	110
中文 (ZH-TW)	116
Română (RO)	121
Србија (SR)	126
Latviešu (LV)	131
Українська (UK)	136
Português Brasil (PT-BR)	142
Қазақша	147
APPENDIX	153
REFERENCES	154

	Specifiche
	Soluzione di lisi VersaLyse pronta all'uso
Forma	Liquido
Volume	100 mL
Numero di flaconi	1 flacone
Volume per provetta	1 mL (pronto all'uso per procedura senza fissaggio concomitante)

VersaLyse Soluzione lisante

REF 1 mL / test, A09777 100 test; 100 mL

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

Questo reagente è utile ai fini della lisi dei globuli rossi durante la preparazione di campioni biologici per l'analisi in citometria a flusso. VersaLyse è compatibile con qualsiasi tipo di citometro e si utilizza dopo l'incubazione, con o senza lavaggio, di anticorpi fluorescenti debitamente calibrati per il protocollo selezionato. I campioni possono essere trattati con questo reagente anche dopo esser stati lavati; ad esempio per eliminare le immunoglobuline sieriche (1,2,3,4,5).

PRINCIPIO

Il campione contenente le emazie da sottoporre a lisi è messo in presenza del reagente VersaLyse per almeno 10 minuti. Il componente attivo principale di VersaLyse è un'ammina ciclica che, a contatto con l'anidrasi carbonica contenuta nelle emazie, si trasforma in un composto altamente litico per queste cellule.

Questo reagente si utilizza con anticorpi coniugati specifici in grado di fissarsi su alcune cellule leucocitarie mediante i determinanti antigenici che esse esprimono. La marcatura specifica dei leucociti avviene tramite l'incubazione del campione con anticorpi specifici. Successivamente, gli eritrociti vengono eliminati tramite lisi e i leucociti, non coinvolti in questa fase, vengono analizzati in citometria a flusso.

I preparati devono essere conservati a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e rapidamente analizzati in citometria a flusso. Qualora si posticipasse l'analisi di alcune ore, possono essere fissati con una piccola quantità di PBS contenente lo 0,1% di formaldeide (Per preparare un PBS contenente lo 0,1% di formaldeide, vedere la Scheda Tecnica della Soluzione Fissante IOTest 3 – Rif. A07800). In tal caso, è necessario un lavaggio prima dell'analisi.

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

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

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza.
2. Non conservare nel frigorifero, non congelare.
3. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce durante l'incubazione del campione con gli anticorpi fluorescenti.
4. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché potrebbe falsare i risultati.
5. La formaldeide è tossica e allergenica. È una sostanza potenzialmente cancerogena. Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con la pelle, le mucose, gli occhi e gli indumenti.
6. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente infetti e devono essere maneggiati con cura (in particolare, indossando guanti, camici e occhiali protettivi).
7. Le provette per il sangue e i materiali monouso usati per la manipolazione devono essere smaltiti in appositi contenitori destinati all'inceneritore.

CLASSIFICAZIONE DEI PERICOLI GHS

Soluzione lisante VersaLyse ATTENZIONE



H315
H319
P280

P337+P313

Provoca irritazione cutanea.
Provoca grave irritazione oculare.
Indossare guanti/indumenti
protettivi e proteggere gli occhi/il
viso.
Se l'irritazione degli occhi persiste,
consultare un medico.
Pirrolidina 1 - 2%



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

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

VersaLyse si conserva a una temperatura compresa tra i 18 e i 25 °C. Qualora un flacone di VersaLyse fosse stato inavvertitamente messo nel frigorifero, riportarlo a temperatura ambiente (18 – 25 °C) e attendere almeno un'ora prima di utilizzarlo.

Il reagente è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone, a condizione che quest'ultimo sia conservato chiuso.

Dopo l'apertura, il reagente mantiene la sua stabilità per 90 giorni.

CAMPIONI

Il sangue venoso o il midollo osseo da analizzare devono essere messi in provette sterili contenenti EDTA come anticoagulante.

N.B.: Nel paragrafo ANTICOAGULANTI, leggere attentamente le circostanze nelle quali è possibile utilizzare altri anticoagulanti.

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

I campioni devono essere analizzati entro 24 ore dalla venipuntura.

CAMPIONI LAVATI

Prima di procedere alla marcatura e successivamente alla lisi dei globuli rossi, è indispensabile eliminare completamente il surnatante dopo l'ultima centrifugata. Un eccesso di tampone di lavaggio sul pellet cellulare può ridurre l'efficacia di VersaLyse.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

La concentrazione di leucociti nel campione deve essere inferiore a 10^4 cellule / μL ($10^{10}/\text{L}$). Se necessario, diluire in una piccola quantità di PBS per riportare la concentrazione leucocitaria a 5×10^3 / μL ($5 \times 10^9/\text{L}$).

La concentrazione di eritrociti nel campione deve essere inferiore a 6×10^6 / μL ($6 \times 10^{12}/\text{L}$); si raccomanda di diluire quest'ultimo in una piccola quantità di PBS al fine di riportare la concentrazione eritrocitaria a 5×10^6 / μL .

Qualora fosse necessario adeguare le concentrazioni leucocitarie ed eritrocitarie, utilizzare il più alto grado di diluizione. Le procedure prevedono l'uso di 100 μL di campione prediluito o normale per ogni provetta.

INDICI DI DETERIORAMENTO

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

In caso il kit fosse danneggiato o i dati ottenuti mostrino un'alterazione della performance, si prega di contattare il distributore locale o di scrivere al indirizzo e-mail seguente :

immuno-techsup@beckmancoulter.com

COMPONENTI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT:

- Provette per campioni e materiale necessario per il campionamento.

- Pipette automatiche e puntali usa e getta destinati a prelevare quantità di 10, 20, 100 e 1.000 µL.
- Provette per emolisi in plastica.
- Sfere di calibrazione: Fluorosfere Flow-Set (Rif. 6607007).
- Anticorpi fluorescenti specifici.
- Controlli isotipici.
- Tampone (PBS: 0,01 M di fosfato di sodio, 0,145 M di cloruro di sodio, pH 7,2).
- Reagente fissante: A titolo di esempio: Soluzione Fissante IOTest 3 (Rif. A07800).
- Centrifugare.
- Agitatore automatico (tipo Vortex).
- Citometro a flusso.

PROCEDURA CON REAGENTE VERSALYSE

N.B.: Le procedure seguenti sono valide per delle applicazioni standard. I volumi di campione e/o di VersaLyse per certe applicazioni Beckman Coulter possono essere diversi. In questo caso, seguire le istruzioni della scheda tecnica di applicazione.

A – Procedura senza fissaggio concomitante

Preparazione del reagente

Non è necessaria alcuna preparazione. Utilizzare VersaLyse direttamente dal flacone.

Per ogni campione analizzato, è necessario prevedere, oltre alla provetta test, 1 provetta di controllo nella quale saranno messe le cellule in presenza del controllo isotipico corrispondendo alla marcatura specifica scelta.

1. In ogni provetta test, aggiungere la quantità di anticorpi raccomandata dal produttore al fine di marcare 5×10^5 leucociti.
2. In ogni provetta di controllo, aggiungere la quantità di controllo isotipico raccomandata dal produttore al fine di marcare 5×10^5 leucociti.
3. Aggiungere 100 µL del campione da testare (prediluito o normale) nelle 2 provette. Agitare delicatamente al vortex.
4. Incubare secondo le istruzioni indicate nella scheda tecnica degli anticorpi utilizzati.
5. Aggiungere 1 mL di VersaLyse e agitare immediatamente al vortex per 1 secondo.
6. Incubare almeno 10 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C) e al riparo dalla luce.

In caso di procedura senza lavaggio, le provette sono pronte per l'analisi al citometro.

N.B.: Se fosse necessario lavare i preparati, non procedere all'analisi prima di aver eseguito i punti da 7 a 11 riportati di seguito.

7. Centrifugare per 5 minuti a 150 x g a temperatura ambiente.

IMPORTANTE: È stato notato che, utilizzando la procedura fissaggio non concomitante con una fase lavaggio, possono formarsi aggregati di cellule, chiamati "escapees" in inglese, che potrebbero determinare risultati errati, a causa del cambiamento nelle loro proprietà di diffusione della luce e del fatto che fuoriescono dalle regioni gating ⁽⁶⁾. Una potente agitazione con vortice potrebbe dissolvere questi aggregati.

8. Rimuovere il surnatante mediante aspirazione.
9. Risospendere il pellet (fondello) cellulare in 3 mL di PBS.
10. Centrifugare per 5 minuti a 150 x g a temperatura ambiente.
11. Eliminare il surnatante tramite aspirazione e risospendere il pellet cellulare in:
 - 0,5 mL o 1 mL di PBS più 0,1% di formaldeide, se i preparati devono essere conservati meno di 24 ore. (È possibile ottenere PBS con formaldeide allo 0,1% diluendo 12,5 µL di soluzione fissante IOTest 3 (REF A07800) alla concentrazione di 10x in 1 mL di PBS).
 - 0,5 o 1 mL di PBS senza formaldeide, se i preparati devono essere analizzati entro 2 ore.

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

B – Procedura con fissaggio concomitante

Preparazione del reagente

Preparare estemporaneamente la miscela "Fix-and-Lyse" aggiungendo 25 µL di Soluzione Fissante IOTest 3 10X* NON DILUITA (Rif. A07800) a 1 mL di VersaLyse.

Agitare su vortex per 3 - 5 secondi.

(*) N.B.: nell'ambito della miscela "Fix-and-Lyse", la Soluzione Fissante IOTest 3 (Rif. A07800) è utilizzata come una soluzione quaranta volte concentrata e non come una soluzione 10X (concentrazione nominale).

Preparare un volume sufficiente di miscela "Fix-and-Lyse", secondo il numero di campioni da sottoporre a lisi, nella misura di 1 mL per provetta.

Per ogni campione analizzato, è necessario prevedere, oltre alla provetta test, 1 provetta di controllo nella quale saranno messe le cellule in presenza del controllo isotipico corrispondendo alla marcatura specifica scelta.

1. In ogni provetta test, aggiungere la quantità di anticorpi raccomandata dal produttore al fine di marcare 5×10^5 leucociti.
2. In ogni provetta di controllo, aggiungere la quantità di controllo isotipico raccomandata dal produttore al fine di marcare 5×10^5 leucociti.
3. Aggiungere 100 µL del campione da testare (prediluito o normale) nelle 2 provette. Agitare delicatamente al vortex.
4. Incubare secondo le istruzioni indicate nella scheda tecnica degli anticorpi utilizzati.
5. Aggiungere 1 mL di miscela "Fix-and-Lyse" e agitare immediatamente per 1 secondo.
6. Incubare almeno 10 minuti a temperatura ambiente (18 – 25 °C) e al riparo dalla luce.

In caso di procedura senza lavaggio, le provette sono pronte per l'analisi al citometro.

N.B.: Se fosse necessario lavare i preparati, non procedere all'analisi prima di aver eseguito i punti da 7 a 11 riportati di seguito.

7. Centrifugare per 5 minuti a 150 x g a temperatura ambiente.
8. Rimuovere il surnatante mediante aspirazione.
9. Risospendere il pellet (fondello) cellulare in 3 mL di PBS.
10. Centrifugare per 5 minuti a 150 x g a temperatura ambiente.
11. Eliminare il surnatante mediante aspirazione e risospendere il pellet cellulare in 0,5 mL o 1 mL di PBS più 0,1% di formaldeide, se i preparati devono essere conservati meno di 24 ore. (È possibile ottenere PBS con formaldeide allo 0,1% diluendo 12,5 µL di soluzione fissante IOTest 3 (REF A07800) alla concentrazione di 10x in 1 mL di PBS).

I preparati possono essere conservati per 24 ore a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C e al riparo dalla luce.

ANTICOAGULANTE

Il sale tripotassico di EDTA (K3EDTA), indipendentemente dal metodo impiegato, con o senza lavaggio dopo la lisi, fornisce i migliori risultati.

L'ACD e l'eparina forniscono ottimi risultati con tutte le procedure, tranne quella senza fissaggio concomitante quando è seguita da un lavaggio. Con tali anticoagulanti, raccomandiamo la procedura con fissaggio concomitante, seguita da un lavaggio.

ANALISI

I residui di eritrociti possono emettere un segnale di diffrazione della luce ("Forward Scatter" o FS) superiore rispetto a quello ottenuto con altri reagenti di lisi commerciali. Per questo motivo, la regolazione consueta (o di default) della soglia ("threshold") in relazione a questo parametro può risultare troppo debole per VersaLyse.

Si raccomanda quindi di regolare il citometro sin dall'inizio dell'acquisizione di un preparato tipo. Nel caso di sangue intero sottoposto a lisi, per esempio, conviene innanzitutto aumentare progressivamente il valore della soglia, affinché le popolazioni leucocitarie siano visibili su un istogramma di tipo FS versus SS e successivamente regolare in modo preciso l'intensità dei segnali FS e SS per ottenere una ripartizione delle popolazioni leucocitarie identica a quella delle figure 1 o 2.

PRESTAZIONI

PUREZZA E PREVALENZA DELLA POPOLAZIONE LINFOCITARIA

La purezza e la prevalenza della popolazione linfocitaria sono state analizzate secondo le indicazioni del CDC (1). Il sangue di 10 donatori sani, prelevato utilizzando K3EDTA, è stato doppiamente marcato per mezzo di una miscela di anticorpi monoclonali: CD45-FITC e CD14-PE. Nelle seguenti tabelle sono riportati i valori medi ottenuti dall'analisi della prevalenza linfocitaria e della purezza della popolazione del campione ottenuti con diverse procedure:

Senza lavaggio			
Senza fissaggio concomitante		Con fissaggio concomitante	
Recupero	Purezza	Recupero	Purezza
96,4	92,3	96,6	91,6
95 / 97,5	90,1 / 94,3	95,4 / 98,1	90,1 / 92,6

Con lavaggio			
Senza fissaggio concomitante		Con fissaggio concomitante	
Recupero	Purezza	Recupero	Purezza
95,6	94,0	96,2	97,2
95 / 97,3	90,3 / 97,3	95,4 / 97,5	92,7 / 99,4

RIPRODUCIBILITÀ INTRALABORATORIO

Lo stesso giorno e con lo stesso citometro, sono state effettuate 31 determinazioni della percentuale di linfociti CD3+ sullo stesso prelievo (sangue intero di un donatore sano). La procedura di lisi utilizzata è quella con fissaggio concomitante e senza lavaggio. Nelle seguenti tabelle sono riportati i risultati ottenuti:

Sangue intero	Numero	Media (%)	SD	CV (%)
Linfociti CD3+	31	60,72	1,61	2,7

LIMITAZIONI

1. La citometria a flusso può produrre falsi risultati se il citometro non viene allineato perfettamente, le perdite di fluorescenza non vengono correttamente compensate e le regioni non vengono posizionate attentamente.
2. Seguendo le procedure descritte nel foglietto illustrativo con le informazioni tecniche, compatibili con le buone pratiche di laboratorio, è possibile ottenere risultati accurati e riproducibili.
3. In caso di iperleucocitosi, diluire il sangue in PBS in modo da ottenere un valore di circa 5×10^9 leucociti/L (7).
4. In caso di poliglobulia, diluire il sangue in un po' di PBS fino a ottenere un valore pari a 5×10^{12} globuli rossi / L (8, 9, 10).
5. VersaLyse deve essere a temperatura ambiente (18 – 25 °C) prima del suo utilizzo.
6. Analizzare i preparati a occhio nudo per valutare l'efficacia della lisi. Se essi appaiono torbidi oppure se gli istogrammi relativi ai valori di diffrazione della luce sono anomali, è probabile che la lisi non sia completa.
7. Gli eritroblasti possono essere lisati in modo incompleto e possono apparire su un istogramma delle diffrazioni della luce nello stesso punto dei leucociti (11).
8. L'acetazolamide, un inibitore dell'anidasi carbonica, può impedire totalmente l'azione di VersaLyse (12).
9. In alcuni stati patologici, come insufficienza renale grave o emoglobinopatie, la lisi degli eritrociti può risultare lenta, incompleta o persino impossibile. In questo caso, è consigliabile isolare le cellule mononucleate usando un gradiente di densità (ad esempio, Ficoll) prima della colorazione (13).

MARCHI COMMERCIALI

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

Legenda dei simboli

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

APPENDIX

- EXAMPLES

The graphs below are biparametric representations (Forward Scatter vs. Side Scatter) of a normal whole blood sample lyzed with VersaLyse (Ref. A09777) using the no fixation concomitant to lysis and NO WASH procedure (Figure 1) or WASH procedure (Figure 2).

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

Figure 1:

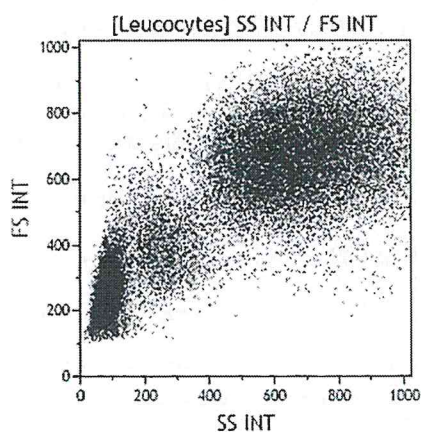
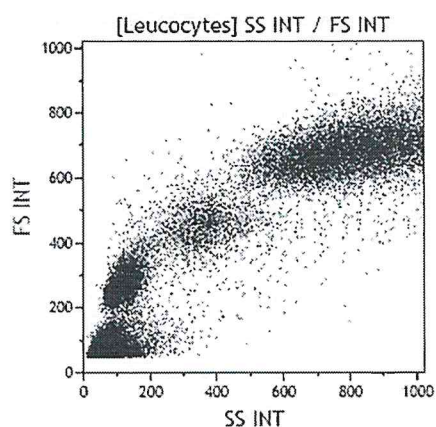


Figure 2:



REFERENCES

1. Nicholson, J.K.A., Hearn, T.L., Cross, G.D., White, M.D., "1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV)", 1997, MMWR 46, RR-21-29.
2. Ashmore, L.M., Shopp, G.M., Edwards, B.S., "Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage", 1989, J. Immunol. Methods, 118, 209-215.
3. Macey, M.G., McCarthy, D.A., Milne, T., Cavenagh, J.D., Newland, A.C., "Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry", 1999, Communications Clinical Cytometry, 38, 153-160.
4. Macey, M.G., McCarthy, D.A., van Agthoven, A., Newland, A.C., "How should CD34+ cells be analysed? A study of three classes of antibody and five leucocyte preparation procedures", J. Immunol. Methods, 204, 175-188.
5. Vuorte, J., Jansson, S-E., Repo, H., "Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay", 2001, Cytometry, 43, 290-296.
6. Lillevang, S.T., Sprogø-Jakobsen, U., Simonsen, B., Kristensen, T., "Three-colour flow cytometric immunophenotyping in HIV-patients; Comparison to dual-colour protocols", 1995, Scand. J. Immunol., 41, 114-120.
7. H42-A2 Vol.27 No. 16. P30. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline - Second Edition.
8. The polycythemia. In Hematology. In Basic Principles and practice. Hoffman R, Benz EJ, Shattil et al. (Eds). Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania; 2005; 1209-1245
9. Silver RT1, Chow W, Orazi A, Arles SP, Goldsmith SJ. Evaluation of WHO criteria for diagnosis of polycythemia vera: a prospective analysis. Blood. 2013 Sep 12;122(11):1881-6
10. Barbui T1, Thiele J, Gisslinger H, et al. Masked polycythemia vera (mPV): results of an international study. Am J Hematol. 2014 Jan;89(1):52
11. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin. Cytom. 2004 Jul; 60B (1):1-13.
12. Kenneth C. Leibman, Donald Alford and Robert A. Boudet. Nature of the inhibition of carbonic anhydrase by acetazolamide and benzthiazide. JPET March 1961 vol. 131 no. 3 271-274.
13. Ibrahim FF, Ghannam MM, Ali FM., "Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients"., 2002. Ren Fail., Nov;24(6):779-90.

IMMUNOTECH SAS 為貝克曼庫爾特分公司, 地址: 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, 電話: +(33) 4 91 17 27 27, 網站:

www.beckman.com

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial

CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil

CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telefone: 0800-771-8818

製造販売業者: ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063

東京都江東区有明三丁目5番7号

TOC有明ウエストタワー

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.

Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



IMMUNOTECH SAS A Beckman Coulter Company, 130, Avenue de Lattre de Tassigny,

BP 177, 13276 Marseille Cedex 9, France, +(33) 4 91 17 27 27

www.beckman.com

PROVETTE IN POLIPROPILENE

Cod. B31974

Utilizzo

Provette da usarsi in analisi citofluorimetriche. Sono costituite in polipropilene che le rende resistenti alle sostanze chimiche e alle temperature estreme. Il materiale è di per sé inerte e ciò rende minimo il rischio di contaminazioni. Sono sottoposte a controllo di qualità continuo in modo da assicurare l'uniformità delle dimensioni fra lotti. Hanno la base arrotondata che rende più semplice la rimozione del contenuto e lo spessore della parete assicura una maggiore resistenza agli urti. Possono essere centrifugate fino alla velocità di 3000g e possono resistere a temperature che oscillano da -190°C a +120°C.

Produttore: Elkay Laboratory Products

Formato: ciascuna provetta è 12 x 75 mm.

Confezionamento: la singola confezione contiene 1000 provette.

Scheda tecnica preparata a cura del Marketing di Beckman Coulter Italia.

DuraClone IM B cells Tube

Cod. B53318 – 25 test

RUO: for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. (Solo per uso in ricerca. Non per diagnosi).

	Specifiche del componente 1	Specifiche del componente 2	Specifiche del componente 3	Specifiche del componente 4	Specifiche del componente 5	Specifiche del componente 6	Specifiche del componente 7	Specifiche del componente 8
Specificità	IgD	CD21	CD19	CD27	CD24	CD38	IgM	CD45
Clone	IA6-2	BL13	J3-119	1A4CD27	ALB9	LS198-4-3	SA-DA4	J33
Immunogeno	IgD umana	Linfociti umani B-CLL	Ibridoma di linfoma SKLY 18	Cellule T umane PHA stimulate	Cellule maligne di midollo osseo	Linea di cellule T umane HUT 78	Catena pesante Ig umana da cellule di mieloma	Linea cellulare Lazz 221
Isotipo	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Specie	Topo	Topo	Topo	Topo	Topo	Topo	Topo	Topo
Fonte	Liquido ascitico o surnatante di cellule di ibridoma in vitro							
Purificazione	Cromatografia di affinità							
Fluorocromo	Isotiocianato di fluoresceina (FITC)	R-Ficoeritrina (PE)	R-Ficoeritrina-Texas Red-X (ECD)	R-Ficoeritrina-Cianina 7 (PC7)	Allofococianina (APC)	Allofococianina-Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Pacific Blue (PB)	Krome Orange (KrO)
λ Eccitazione	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633 nm	405 nm	405 nm
Picco di emissione	523 nm	575 nm	613 nm	767 nm	650 nm	775 nm	455 nm	528 nm

BACKGROUND

La funzione principale delle cellule B (CD45⁺CD19⁺) nel sistema immunitario umano è di riconoscere e memorizzare la struttura immunogenica e alla fine differenziarsi in plasmacellule che producono anticorpi verso questi antigeni riconosciuti e memorizzati. Le fasi di maturazione tardive delle cellule B sono limitate ai compartimenti periferici e possono essere descritte sulla base di una classificazione precedentemente pubblicata¹. Il passaggio dal midollo osseo ai compartimenti periferici è associato all'espressione sulla superficie di immunoglobuline delle classi isotipiche M e D (IgM, IgD). Tra le cellule B IgM⁺, elevate espressioni di CD24 con assenza di CD27 identifica le cellule B di transizione, dalle prime fasi di maturazione nei compartimenti periferici. L'acquisizione dell'espressione di CD27 identifica la transizione da naïve a fenotipo della zona marginale, l'ulteriore acquisizione di CD38 a bassa espressione rivela l'identità di memoria (commutazione nell'isotipo dell'immunoglobulina). La perdita dell'espressione in superficie di IgM e IgD è indice della commutazione della classe isotipica dell'immunoglobulina, determinante l'incremento delle cellule memoria di classe commutata CD27⁺CD38⁻ o plasmablasti CD27⁺CD38⁺⁺.

APPLICAZIONI

Il pannello DuraClone IM è utilizzato per identificare le sottopopolazioni cellulari in campioni di sangue intero umano mediante citometria.

DuraClone IM B cells Tube è una miscela a 8 colori di 8 anticorpi monoclonali, che consente di identificare le sottopopolazioni di linfociti B presenti in campioni di sangue intero. Questo reagente si intende da utilizzare su un citometro a flusso dotato di tre laser:

- un laser a 488 nm in grado di rilevare lo scatter della luce (forward e side) e l'emissione delle fluorescenze negli intervalli seguenti: 504 – 545 nm, 560 – 600 nm, 605 – 635 nm, 680 – 710 nm e > 755 nm.
- Un laser a 638 nm in grado di rilevare l'emissione della luce negli intervalli seguenti: 650 – 670 nm, 715 – 735 nm e > 755 nm.
- Un laser a 405 nm in grado di rilevare l'emissione di fluorescenza negli intervalli seguenti: 430 – 470 nm e 530 – 570 nm.

PRINCIPIO DEL TEST

Questo test si basa sulla capacità di specifici anticorpi monoclonali di legarsi ai determinanti antigenici espressi dai linfociti B. La marcatura specifica dei leucociti si effettuano incubando il campione con IM B cells Panel. Gli eritrociti sono poi rimossi tramite lisi e i leucociti, che non sono influenzati da questo processo, sono acquisiti e analizzati al citofluorimetro. Il citofluorimetro a flusso misura la diffusione della luce e la fluorescenza delle cellule. Esso permette la delimitazione della popolazione di interesse all'interno di una finestra elettronica definita su un istogramma, che correla la diffusione ortogonale della luce (Side Scatter o SS) e la diffusione ad angolo ridotto (Forward Scatter o FS). Altri istogrammi che associano due dei diversi parametri disponibili sul citometro, possono essere utilizzati come supporto nello stadio di "gating". La fluorescenza delle cellule delimitate viene analizzata al fine di distinguere gli eventi marcati positivamente da quelli non marcati. La strategia di "gating" consente la rilevazione delle sottopopolazioni di cellule B circolanti. I risultati sono espressi come percentuale di eventi positivi.

CONTENUTO DEL KIT

DuraClone IM B cells Tube, 25 test, RUO contiene:

- 25 test di DuraClone IM B cells Tube (una singola provetta è un test).
- 3 kit di compensazione, ciascuno dei quali contiene otto provette, ciascuna a singolo colore:
 - CD4-FITC
 - CD4-PE
 - CD19-ECD
 - CD27-PC7
 - CD4-APC
 - CD38-APC-A750
 - CD4-Pacific Blue
 - CD8-Krome Orange

AVVERTENZE

1. Non utilizzare le provette per la compensazione e per l'analisi dopo la data di scadenza.
2. Non conservare le provette in frigorifero; non congelare/scongelerare le provette.
3. Tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente capaci di trasmettere infezioni e come tali maneggiati con attenzione (guanti protettivi, camici ed occhiali devono essere utilizzati quando si maneggiano campioni di sangue).
4. Le provette contenenti il sangue e il materiale usa e getta utilizzato per la manipolazione devono essere smaltiti in appositi recipienti destinati all'incenerimento.
5. Ridurre al minimo l'esposizione delle provette alla luce, specialmente durante l'incubazione dei campioni marcati con gli anticorpi coniugati e durante il processamento dei campioni prima dell'acquisizione.
6. Devono essere utilizzate pipette calibrate per dispensare i campioni di sangue e le pipette devono essere azionate in accordo con le istruzioni del produttore.

CONDIZIONI DI STOCCAGGIO

Conservare le provette di DuraClone IM B cells Tube, 25 test, RUO così come le provette del kit di compensazione fra 20°C e 30°C, in luogo asciutto e protette dall'esposizione alla luce diretta e dall'umidità. Fare riferimento all'etichetta del kit per la data di scadenza del reagente.

INDICI DI DETERIORAMENTO

Qualsiasi danno alle provette di reagente può essere indice di deterioramento del prodotto e in tal caso, lo stesso non deve essere utilizzato. Contattate il distributore locale o potete contattare Beckman Coulter al seguente indirizzo e-mail: duraclone-support@beckman.com.

REQUISITI DELLO STRUMENTO

Questo reagente è ideato per essere utilizzato con un citofluorimetro in grado di rilevare forward e side scatter e compatibile con gli spettri di emissione dei fluorocromi utilizzati nel reagente. Questo reagente è compatibile con *Navios.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

I campioni di sangue intero venoso devono essere raccolti in provette dedicate contenenti un anticoagulante. Seguire le indicazioni del produttore delle provette per il volume minimo di sangue che può essere raccolto. Il campione deve essere conservato fra 18 e 26°C.

MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

- Provette per il prelievo di sangue contenenti anticoagulante.
- Pipette calibrate.
- Miscelatore Vortex.
- Liquido di trascinamento.
- Fluorosfere di calibrazione del citometro a flusso.
- Flow-Check Pro (cod. per Italia A63493). (Per la verifica dell'allineamento del citofluorimetro Navios).
- Fluorosfere Flow-Set Pro (cod. per Italia A63492). (Per la standardizzazione del citofluorimetro Navios).
- VersaLyse Lysing Solution (cod. A09777).
- IOTest 3 Fixative Solution 10X (cod. A07800)
- Citofluorimetro.

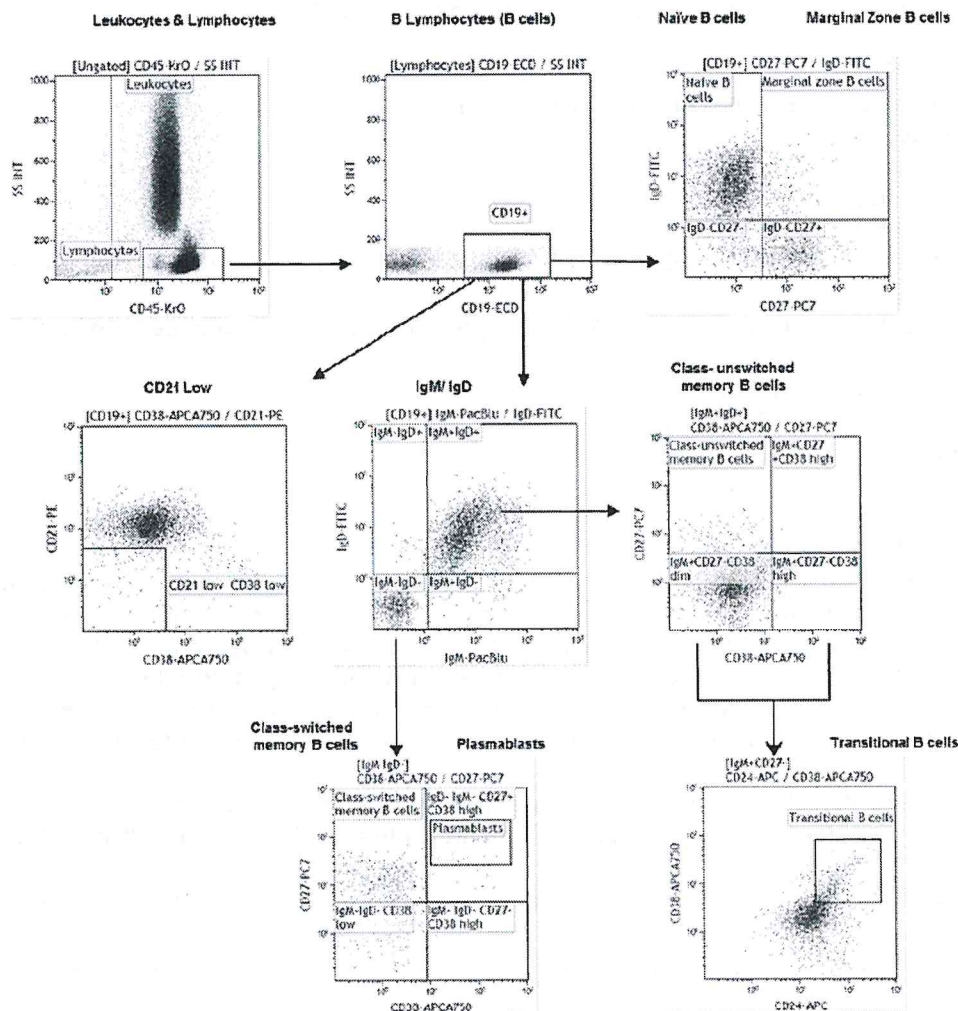
PROCEDURA**PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

1. Aggiungere 10 ml di PBS 1X a 300 µl di sangue intero fresco, in una provetta da 10 ml con fondo conico e centrifugare la stessa a 300 x g per 10 minuti; aspirare il surnatante e riportare in sospensione il pellet in 10 ml di PBS 1X. Centrifugare nuovamente la provetta a 300 x g per 5 minuti, aspirare il surnatante e riportare in sospensione il pellet in 300 µl di PBS 1X.
2. Aggiungere 100 µl di sangue intero lavato ad una provetta reagente, miscelare al Vortex ad alta velocità per 6-8 secondi e porre in incubazione la provetta per 15 minuti, protetta dall'esposizione diretta alla luce, fra 20 e 30°C.
3. Aggiungere 2 ml di VersaLyse Solution, miscelare al Vortex la provetta ad alta velocità per 1-3 secondi e porre in incubazione la provetta per 15 minuti protetta dall'esposizione diretta alla luce, fra 20 e 30°C.
4. Centrifugare la provetta a 200 x g per 5 minuti; aspirare il surnatante, toccare delicatamente il pellet cellulare.
5. Effettuare un lavaggio riportando in sospensione il pellet cellulare in 3 ml di PBS 1X e centrifugando la provetta a 200 x g per 5 minuti; aspirare il surnatante, toccare delicatamente il pellet cellulare e riportarlo in sospensione in 500 µl di PBS 1X contenente 0.1% di IOTest 3 Fixative Solution. Il campione a questo punto è pronto per essere acquisito.

SETTAGGIO DELLA COMPENSAZIONE

1. Marcare tutte le otto provette a singolo colore della compensazione prelevandole da un singolo sacchetto del kit di compensazione fornito con DuraClone IM B cells Tube, 25 test, RUO, ciascuna con 100 µl di sangue intero fresco, porle in incubazione per 15 minuti, protette dall'esposizione diretta alla luce, fra 20 e 30°C e poi seguire i passaggi 3-5 della procedura di preparazione del campione per preparare le otto provette di compensazione.
2. Acquisizione dei campioni su Navios: l'AutoSetup Scheduler sul citofluorimetro Navios raggruppa le applicazioni selezionate per un settaggio efficiente nel campionamento dei comuni campioni di compensazione quando si schedulano applicazioni multiple e fornisce il rapporto del carosello caricato al fine di facilitare il settaggio e il caricamento dei campioni per il QC giornaliero. Per effettuare il settaggio delle compensazioni utilizzando AutoSetup Scheduler, si faccia riferimento alla nota applicativa "Compensation Setup for High Content DuraClone reagents", scaricabile dal sito web di Beckman Coulter: www.duraclone.com.
3. Per tutti gli altri utilizzatori di citometro a flusso, si prega di seguire le procedure standard per la compensazione e le istruzioni del produttore dello strumento.

ANALISI DEI CAMPIONI (raccomandata)



1. Creare un appropriato protocollo di analisi per definire i gate delle popolazioni e una serie di istogrammi a due parametri per l'analisi delle specificità.
2. Impostare il discriminatore del parametro FS tale che i linfociti non siano esclusi dall'acquisizione.
3. Impostare un dot-plot CD45-Krome Orange vs SSC e disegnare una regione che comprenda i leucociti CD45⁺.
4. Impostare un dot-plot CD19-ECD vs SSC e disegnare una regione che comprenda le cellule CD19⁺. Le cellule CD19⁺ sono i linfociti B.
5. Impostare tre dot-plot e applicare la finestra CD19⁺ a tutti e tre:
 - a. CD27-PC7 vs IgD-FITC. Disegnare un quadrante per racchiudere la popolazione cellulare IgD⁺ CD27⁻; questa è la popolazione di cellule B naïve. Delimitare con una finestra la popolazione IgD⁺ CD27⁺; queste sono le cellule B della zona marginale.
 - b. CD38-APC-Alexa Fluor 750 vs CD21-PE. Disegnare un quadrante per delineare la popolazione cellulare CD21^{low} CD38^{low}.
 - c. IgM-Pacific Blue vs IgD-FITC. Disegnare un quadrante per delineare le popolazioni cellulari IgD⁻ IgM⁻, IgD⁺ IgM⁻, IgD⁺ IgM⁺, IgD⁻ IgM⁺.
6. Impostare un dot-plot CD38-APC-Alexa Fluor 750 vs CD27-PC7 e applicare il gate IgD⁻ IgM⁻ al dot plot. Disegnare un quadrante per delineare quanto segue:
 - a. Popolazione IgD⁻ IgM⁻ CD38⁻ CD27⁺: queste sono le cellule B memoria a commutazione di classe.
 - b. Popolazioni IgD⁻ IgM⁻ CD38^{low} CD27⁻.
 - c. Popolazione IgD⁻ IgM⁻ CD38^{high} CD27⁻.
 - d. IgD⁻ IgM⁻ CD38^{high} CD27⁺. Questi sono i plasmablasti.
7. Impostare i seguenti dot-plot e applicare loro il gate IgD⁺ IgM⁺:
 - a. CD38-APC-Alexa Fluor 750 vs CD27-PC7. Disegnare un quadrante per delineare quanto segue:
 - i. Popolazione IgM⁺ CD27⁻ CD38^{dim}.
 - ii. Popolazione IgM⁺ CD27⁺ CD38⁻. Queste sono le cellule B memoria senza commutazione di classe.
 - iii. Popolazione IgM⁺ CD27⁺ CD38^{high}.
 - iv. Popolazione IgM⁺ CD27⁻ CD38⁻.
 - b. CD24-APC vs CD38-APC-Alexa Fluor 750: disegnare una regione che racchiuda le cellule B di transizione applicando il gate booleano IgM⁻ CD27⁻ CD38^{dim} OR IgM⁻ CD27⁻ CD38^{high}.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

1. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. Blood. 2008 Jan 1; 111(1):77-85.

DISPONIBILITA' DEL PRODOTTO

DuraClone IM B Cells Tube, 25 Test, RUO
Cod. B53318

MARCHI

Beckman Coulter, il logo stilizzato, Navios e VersaLyse Solution sono marchi di Beckman Coulter, Inc. e sono registrati all'USPTO (United States Patent and Trademark Office). DuraClone, FlowCheck, FlowSet e Krome Orange sono marchi di Beckman Coulter, Inc.



*Navios è dotato di marchio CE per uso diagnostico in vitro (IVD) a 10 colori. Negli U.S.A., Navios è un dispositivo destinato all'uso come IVD per immunofenotipizzazione con il software tetra Navios e i reagenti CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 e CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD19-ECD/CD3-PC5 CD56-RD1. Tutti altri usi sono solo per scopo di ricerca (RUO).

IOTest è un marchio di Immunotech S.A. ed è registrato all'USPTO.

Alexa Fluor e Pacific Blue sono marchi registrati di Molecular Probes, Inc.

Per informazioni aggiuntive o nel caso il prodotto ricevuto sia danneggiato, scrivere una e-mail al servizio clienti Beckman Coulter duraclone-support@beckman.com o contattare il rappresentante locale di Beckman Coulter.

Produttore: Beckman Coulter India Pvt. Ltd. 50-B, II Phase, Peenya Industrial Area Peenya, Bangalore 560058, India

Stampato in India

©2014 Beckman Coulter, Inc. tutti i diritti riservati.

Revisione 1.0, Settembre 2014

- Versione iniziale.

Traduzione di cortesia a cura del Marketing di Beckman Coulter Italia

DuraClone IM B cells Tube, 25 tests, RUO

REF B53318 – 25 tests

IFU- B53318-1.0



	Specifications of Constituent 1	Specifications of Constituent 2	Specifications of Constituent 3	Specifications of Constituent 4	Specifications of Constituent 5	Specifications of Constituent 6	Specifications of Constituent 7	Specifications of Constituent 8
Specificity	IgD	CD21	CD19	CD27	CD24	CD38	IgM	CD45
Clone	IA6-2	BL13	J3-119	1A4CD27	ALB9	LS198-4-3	SA-DA4	J33
Immunogen	Human IgD	Human B-CLL lymphocytes	SK LY18 Lymphoma Hybridoma	PHA stimulated human T cells	Bone marrow malignant cells	Human T cell line HUT 78	Human Ig heavy-chain from myeloma cells	Laz 221 cell line
Isotype	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Species	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse
Source	Ascites fluid or supernatant of in vitro cultured hybridoma cells							
Purification	Affinity chromatography							
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycoerythrin (PE)	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Allophycocyanin (APC)	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Pacific Blue	Krome Orange
λ Excitation	488 nm	488 nm	488 nm	488 nm	633 nm	633 nm	405 nm	405 nm
Emission peak	523 nm	575 nm	613 nm	767 nm	650 nm	720 nm	455 nm	528 nm

For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.

BACKGROUND

The major function of B cells (CD45+CD19+) in the human immune system is to recognize and memorize immunogenic structures and to terminally differentiate into plasma cells that produce antibodies against these recognized or memorized antigens. Late maturation stages of B cells are confined to peripheral compartments and can be described based on a previously published classification.¹ The passage from bone marrow into peripheral compartments is associated with surface expression of immunoglobulin of the isotype classes M and D (IgM, IgD). Among IgM+ B cells high expression of CD24 along with absence of CD27 identifies transitional B cells, the earliest stage of maturation in peripheral compartments. Acquisition of CD27 expression identifies transition from a naïve to a marginal zone phenotype, further acquisition of low CD38 expression reveals memory identity (non-isotype -class-switched). Loss of IgM and IgD surface expression is indicative of immunoglobulin isotype class switching giving rise to CD27+CD38- class-switched memory cells or CD27+CD38++ plasmablasts.

APPLICATION

The DuraClone IM panels are used to identify cell subpopulations in human whole blood samples by flow cytometry.

The DuraClone IM B cells Tube is an 8-color, 8-monoclonal antibody reagent that allows the identification of B lymphocyte subpopulations present in whole blood samples. This reagent is intended to be used on a flow cytometer with three lasers:

- A 488 nm laser capable of detecting light scatter (forward and side) and a fluorescence emission in the following ranges: 504-545 nm, 560 – 600 nm, 605 – 635 nm, 680 – 710 nm and >755nm.
- A 638 nm laser capable of detecting light emission in the following ranges: 650-670 nm, 715-735nm and > 755 nm.
- A 405 nm laser capable of detecting the fluorescence emission in the following ranges: 430-470 nm and 530-570nm.

PRINCIPLE

This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by B lymphocytes. Specific staining of the leukocytes is performed by incubating the sample with IM B cells Panel. The erythrocytes are then removed by lysis and the leukocytes, which are unaffected by this process, are acquired and analyzed by flow cytometry. The

flowcytometer measures light diffusion and the fluorescence of cells. It enables the delimitation of the population of interest within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the diffusion of narrow angle light (Forward Scatter or FS). Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer can be used as supports in the gating stage. The fluorescence of the delimited cells is analyzed in order to distinguish the positively stained events from the unstained ones. The gating strategy allows detection of circulating B cell subpopulations. The results are expressed as a percentage of positive events.

KIT BOX CONTENTS

The DuraClone IM B cells Tube, 25 tests, RUO contains the following:-

- 25 tests of the DuraClone IM Basic Tube (i.e. a single tube is a single test).
- 3 compensation kits; each kit containing eight tubes, each containing a single color i.e.:
 - CD4-FITC
 - CD4-PE
 - CD19-ECD
 - CD27-PC7
 - CD4-APC
 - CD38-APC-A750
 - CD4-Pacific Blue
 - CD8-Krome Orange

STATEMENT OF WARNINGS

1. Do not use the reagent or compensation tubes beyond the expiry date.
2. Do not store the tubes in the refrigerator; do not freeze/thaw the tubes.
3. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (protective gloves, gowns and goggles must be used while handling blood samples).
4. Tubes containing blood and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.
5. Minimize the exposure of light to the tubes, especially during incubation of sample stained with fluorescent antibodies or during lysis and after processing of sample, before use.
6. A calibrated pipette should be used for the addition of blood samples and the pipette should be operated according to the manufacturer's instructions.

STORAGE CONDITIONS

Store the tubes of the DuraClone IM B cells Tube, 25 tests, RUO as well as the tubes from the compensation kit between 20°C and 30°C, in a dry place and protect them from the direct exposure to light and moisture. Refer to the kit label for the date of expiry of the reagent.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any damage to the reagent tube may indicate product deterioration and the product should not be used. Please contact your local distributor or you can contact Beckman Coulter at the following email address: duracclone-support@beckman.com

INSTRUMENT REQUIREMENTS

This reagent is designed to be used on a flow cytometer capable of detecting forward and side scatter, and compatible with the emission spectra of the fluorochromes used in the reagent. This reagent is compatible with *Navios.

SPECIMEN COLLECTION

The venous blood sample should be collected in a blood collection tube containing anticoagulant. Follow the collection tube manufacturer's guidelines for the minimum volume of blood to be collected. The sample must be stored between 18°C and 26°C.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Blood collection tube containing anticoagulant
- Calibrated pipettes
- Vortex mixer
- Sheath fluid
- Flow cytometer calibration beads
- Flow-Check Pro Fluorospheres (REF. A69183) (For Navios alignment verification)
- Flow-Set Pro Fluorospheres (REF. A69184) (For Navios standardization)
- VersaLyse Solution (REF. A09777)
- IOTest 3 Fixative solution (REF. 8546859)
- Flow cytometer

PROCEDURE SAMPLE PREPARATION

1. Add 10mL 1X PBS to 300 µL of fresh whole blood, to a 15 mL conical tube and centrifuge the tube at 300 x g for 10 minutes; aspirate the supernatant and re-suspend the pellet in 10 mL of 1X PBS. Centrifuge the tube again at 300 x g for 5 minutes aspirate the supernatant and re-suspend the pellet in 300 µL of 1X PBS.
2. Add 100 µL of washed whole blood to reagent tube, vortex at high speed for 6-8 seconds and incubate the tube for 15 minutes, protected from the direct exposure to light, between 20 and 30°C.
3. Add 2 mL of VersaLyse Solution, vortex the tube at high speed for 1-3 seconds and incubate the tube for 15 minutes protected from the direct exposure to light, between 20 and 30°C.
4. Centrifuge the tube at 200 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet.

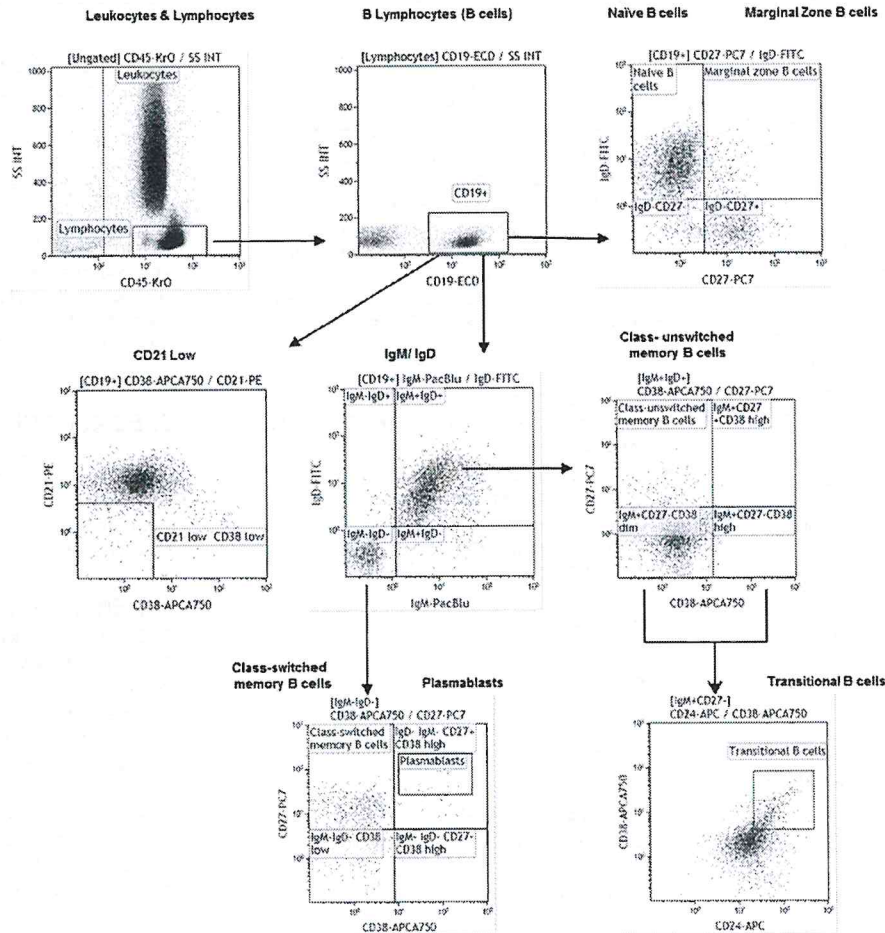
- Perform a wash step by re-suspending the cell pellet in 3mL 1X PBS and centrifuging the tube at 200 x g for 5 minutes; aspirate the supernatant, gently tap the cell pellet and re-suspend the cell pellet in 500µL of 1X PBS containing 0.1% IO Test 3 Fixative Solution. The sample is now ready for acquisition.

COMPENSATION SETUP

- Stain all the eight single color tubes from a single pouch of the Compensation Kit provided in the IM DuraClone B cells Tube, 25 tests, RUO with 100 µL of fresh whole blood each, incubate all the eight tubes for 15 minutes, protected from the direct exposure to light, between 20 and 30°C and then follow steps 3-5 in the Sample Preparation procedure for preparing the eight compensation tubes.

- For sample acquisition on Navios: The AutoSetup Scheduler on the Navios flow cytometer groups the selected applications for efficient set up in sampling from common compensation samples when scheduling multiple applications and provides the carousel load report to facilitate setting up and loading samples for daily QC. For setting up compensation using AutoSetup Scheduler, refer to the Application Note "Compensation Setup for High Content DuraClone reagents", downloadable from the Beckman Coulter website: www.duraclone.com
- For all other flow cytometer users, please follow standard procedures and instrument manufacturer instructions for compensation.

SAMPLE ANALYSIS (Recommended)



- Create an appropriate analysis protocol to define the population gates and the series of dual parameter plots for analysis of the reagent specificities.
- Set the discriminator on the FS parameter such that the lymphocytes are not excluded from the acquisition.
- Create a CD45-KrOrange (Krome Orange) vs. SSC dot plot and create a region to encompass the CD45+ leukocytes
- Create a CD19- ECD vs. SSC dot pot and create a region to encompass the CD19+ cells. The CD19+ cells are the B lymphocytes (i.e. B cells).
- Create three dot plots and apply the CD19+ gate on all the three plots:
 - CD27-PC7 vs. IgD-FITC: Draw a quadrant to gate the IgD+ CD27- cell population; this is the naive B

cell population. Gate the IgD+ CD27+ population; these are the marginal zone B cells.

- CD38 -AA750 vs. CD21-PE. : Draw a quadrant to delineate the CD21 low CD38 low cell population.
 - IgM-PacBlu (i.e. Pacific Blue) vs. IgD-FITC: Draw a quadrant to delineate the IgD-IgM-, IgD+IgM-, IgD-IgM+ cell populations.
- Create a CD38 AA750 vs. CD27-PC7 dot plot and apply the IgD-IgM- gate onto the plot. Draw a quadrant to delineate the following:
 - IgD-IgM- CD38-CD27+population: These are the class-switched memory B cells.
 - IgD-IgM- CD38-low CD27- population.
 - IgD-IgM- CD38+ high CD27- population.

- IgD-IgM-CD38+ high CD27+ population: These are the plasmablasts.

- Create the following dot plots and apply the IgD+IgM+ gate onto them:
 - CD38-APC-A750 vs. CD27-PC7: Draw a quadrant to delineate the following:
 - IgM+CD27-CD38 dim population
 - IgM+CD27+CD38- population: These are the class-unswitched memory B cells.
 - IgM+CD27+ CD38+high population
 - IgM+ CD27-CD38- population.
 - CD24-APC vs. CD38-APC-A750: Draw a region to encompass the transitional B cells by applying the Boolean gate IgM-CD27-CD38 dim OR IgM-CD27-CD38 high.

REFERENCES

1. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Wamatz K. Blood. 2008 Jan 1; 111(1):77-85.

PRODUCT AVAILABILITY

DuraClone IM B cells Tube, 25 tests, RUO

 B53318

TRADEMARKS

Beckman Coulter, the stylized logo, Navios and VersaLyse Solution are trademarks of Beckman Coulter, Inc., and are registered in the USPTO. DuraClone, Flow-Check, Flow-Set and Krome Orange are trademarks of Beckman Coulter, Inc.

*Navios is CE marked for 10-color in vitro diagnostic (IVD) use. In the U.S.A., Navios is intended for use as an IVD device for immunophenotyping with Navios tetra software and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 and CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 reagents. All other uses are for research use only (RUO).

IOTest is a trademark of immunotech S.A. and is registered in the USPTO.

Alexa Fluor and Pacific Blue are registered trademarks of Molecular Probes, Inc.

For additional information, or if a damaged product is received, email Beckman Coulter Customer Service at duraclone-support@beckman.com or contact your local Beckman Coulter Representative.



Beckman Coulter India Pvt. Ltd.
50-B, III Phase, Peenya Industrial Area
Peenya, Bangalore 560058, India

Printed in India

© 2014 Beckman Coulter, Inc.
All Rights Reserved.

Revision 1.0, September 2014

■ Initial Release

Test Beckman scheda tecnica

Da provveditorato@ospedale.caserta.it <provveditorato@ospedale.caserta.it>
A **immunoematologia** <immunoematologia@ospedale.caserta.it>
Data lunedì 15 maggio 2023 - 11:28

Con la presente si trasmette in allegato la scheda tecnica relativa all'offerta pervenuta per la fornitura emarginata in oggetto, ai fini della relativa valutazione di conformità.

Restasi in attesa di riscontro.

Cordialmente

*U.O.C. Provveditorato ed Economato
AORN Sant'Anna e San Sebastiano – Caserta
Via Palasciano 81100 – Caserta - Tel. 0823/232462
e-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it
PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it*

8546859_ST.pdf
A09777_ST_IT.pdf
B31974 provette.pdf
B53318_ST.pdf
B53328_ST.pdf

Re: Test Beckman scheda tecnica

Da immunoematologia <immunoematologia@ospedale.caserta.it>

A provveditorato@ospedale.caserta.it <provveditorato@ospedale.caserta.it>

Data lunedì 15 maggio 2023 - 11:39

Buongiorno,
in merito ai prodotti richiesti e dalle schede tecniche allegate dal produttore, si conferma la conformità dei prodotti offerti.

Cordiali saluti

Dott.ssa S.Raimondi ✱

Dr.ssa Anna Sonia Raimondi

Direttore UOC Immunoematologia e Medicina Trasfusionale

AORN Sant'Anna e San Sebastiano

Caserta

Da provveditorato@ospedale.caserta.it

A "immunoematologia" immunoematologia@ospedale.caserta.it

Cc

Data Mon, 15 May 2023 11:28:54 +0200

Oggetto Test Beckman scheda tecnica

Con la presente si trasmette in allegato la scheda tecnica relativa all'offerta pervenuta per la fornitura emarginata in oggetto, ai fini della relativa valutazione di conformità.

Restasi in attesa di riscontro.

Cordialmente

✱ Si precisa, inoltre, che le strumentazioni è compatibile con i reagenti richiesta. La necessità di scegliere che detto Beckman, nasce dal fatto che con quest'ultima abbiamo già un contratto in essere e per tali motivi non vi è altre strumentazioni presso questo UOC.

A.O.R.N. SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO
CASERTA
U.O.C. di Immunoematologia e Centro
Trasfusionale
Direttore Dott.ssa Sonia Anna Raimondi
29/5/23

U.O.C. Provveditorato ed Economato

AORN Sant'Anna e San Sebastiano – Caserta

Via Palasciano 81100 – Caserta - Tel. 0823/232462

e-mail: provveditorato@ospedale.caserta.it

PEC: provveditorato@ospedalecasertapec.it



ATTESTAZIONE DI VERIFICA E REGISTRAZIONE CONTABILE

relativa alla DETERMINA DIRIGENZIALE con oggetto:

Fornitura di test ex art. 2 com. 1 lett. a) del D. Lgs. 76/2020 convertito con L. 120/20250 e s.m.i., finalizzati alla ricerca del monitoraggio della memoria immunitaria nell'infezione da SARS-Cov. 2.

ATTESTAZIONE DI VERIFICA E REGISTRAZIONE CONTABILE 1 (per le proposte che determinano un costo per l'AORN)

Il costo derivante dal presente atto : €15.225,60

- è di competenza dell'esercizio 2023 , imputabile al conto economico 5010105010 - Dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD) da scomputare dal preventivo di spesa che presenta la necessaria disponibilità
- è relativo ad acquisizione cespiti di cui alla Fonte di Finanziamento

Caserta li, 31/05/2023

il Direttore
UOC GESTIONE ECONOMICO FINANZIARIA
Carmela Zito