

CD34Count Kit

Code No. K2370/ Réf. K2370/ Code Nr. K2370

1st edition/ 1ère édition/ 1. Ausgabe

For the identification and enumeration of CD34+ cells in human mobilized blood samples and leukapheresis samples.

The kit contains reagents sufficient for 50 duplicate tests.

Pour l'identification et la numération des cellules CD34+ dans les échantillons de sang humain mobilisé et les échantillons prélevés par leucophérèse.

Ce kit contient suffisamment de réactifs pour 50 tests en double.

Zum Nachweis und zur Auszählung von CD34-positiven Zellen in mobilisierten humanen Blut- und Leukaphereseproben.

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für 50 Doppel-Tests.

Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

ENGLISH

Intended Use	5
Summary and Explanation	5
Principle of the Procedure.....	5
Reagents	6
Materials provided	6
Materials required but not provided	6
Reagent Preparation.....	7
Precautions.....	7
Storage	8
Specimen Collection and Preparation	8
Staining Procedure	8
Staining of cells and addition of count control beads	8
Guideline, “wet tip” reverse pipetting technique.....	9
Quality Control	10
Control sample	10
Time as quality control	10
Duplicate tests.....	10
Data Acquisition	10
Acquisition set-up for CD34Count Kit	10
Analysis of Data	13
Results.....	13
Value Assignment.....	14
Limitations	14
Troubleshooting	15
Instrument.....	15
References	40
Explanation of symbols	40

FRANÇAIS

Utilisation prévue	16
Résumé et explication.....	16
Principe de la procédure	17
Réactifs.....	17
Matériels fournis	17
Matériels requis mais non fournis	18
Préparation des réactifs	18
Précautions.....	18
Conservation.....	19
Prélèvement et préparation des échantillons	19
Procédure de coloration.....	20
Coloration des cellules et ajout des billes de contrôle du comptage	20
Procédure pour la technique de pipetage inversé « à embout mouillé ».....	20
Contrôle qualité.....	21
Échantillon de contrôle	21
Le temps comme contrôle qualité.....	21
Tests en double.....	21
Acquisition des données	21
Réglage de l'acquisition pour le CD34Count Kit	22
Analyse des données.....	24
Résultats.....	25
Affectation des valeurs.....	25
Limites	25
Dépannage	26
Instrument.....	26
Références	40
Explication des symboles.....	40

DEUTSCH

Verwendungszweck	28
Zusammenfassung und Erklärung	28
Verfahrensprinzip.....	28
Reagenzien.....	29
Mitgelieferte Materialien	29
Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material.....	29
Reagenzvorbereitung.....	30
Vorsichtsmaßnahmen	30
Aufbewahrung.....	31
Probenentnahme und -vorbehandlung	31
Färbeverfahren	32
Färben von Zellen und Zugabe von Zählkontrollperlen.....	32
Richtlinie, Reverse-Pipetting-Verfahren „mit vorbefeuchteter Spitze“	32
Qualitätskontrolle	33
Kontrollprobe	33
Zeitdauer als Qualitätskontrolle	33
Doppel-Tests.....	33
Datenerfassung	33
Erfassungseinstellung für das CD34Count Kit.....	34
Datenanalyse.....	36
Ergebnisse.....	37
Wertzuordnung	37
Beschränkungen.....	37
Fehlersuche und -behebung	38
Gerät	39
Literatur	40
Erläuterung der Symbole	40

ENGLISH

Intended Use

For in vitro diagnostic use in flow cytometry. CD34Count Kit is intended for use as an in vitro diagnostic test to identify and enumerate CD34-positive (CD34+) haematopoietic stem cells in human mobilized peripheral blood samples and leukapheresis samples.

Summary and Explanation

Haematopoietic progenitor cells (HPCs) can be mobilized from the bone marrow into the peripheral blood (PB) by cytotoxic drugs, cytokines, or combinations of the two. This mobilization allows the collection of HPCs by apheresis in sufficient quantities for transplantation procedures (1, 2). The use of PB stem cells (PBSCs) for transplant purposes has rapidly increased during the past decade, and for autologous transplantation PB is now preferred as a source of HPCs over bone marrow (BM). Traditionally, the absolute mononuclear cell count of BM harvests in relation to the body weight of the recipient has served as a useful predictor of engraftment potential. However, this approach is insufficient for mobilized PBSC collections owing to their variable HPC content. By the late 1980s, it was established that virtually all of the CFC (colony-forming cell) activity and engraftment potential of marrow or peripheral blood samples were contained in the small population of cells bearing the CD34 antigen (3). CD34 is a cell surface antigen, which on haematopoietic cells is restricted to early progenitors of all lineages (1, 2). Thus, CD34+ HPCs can restore multilineage haematopoiesis in myelo-ablated patients. The number of CD34+ cells as determined by flow cytometry per kilogram of recipient body weight has been shown to be the most useful indicator of the haematopoietic reconstitutive capacity of peripheral blood stem cell (PBSC) transplants (1, 2).

Sutherland et al. (5) developed a set of clinical guidelines for the "International Society for Hematotherapy and Graft Engineering" (ISHAGE) for simple and standardized CD34+ enumeration. These guidelines have been adopted in the CD34Count Kit that contains Anti-CD45/FITC and Anti-CD34/RPE, and thus allows the identification of leukocytes (CD45+) and the verification of "true" CD34+ cells as being dim for CD45 fluorescence and having low side scatter (CD45^{dim}, SSC^{low}). The addition of the CytoCount™ counting beads to the cell suspension yields the concentration of CD34+ cells per unit of original specimen volume (i.e. the absolute CD34+ cell count) from a single flow-cytometric assessment (single-platform technique) (1-3). The single-platform technique has fewer sources of variability compared with the previously commonly used dual-platform technique, and multicentre studies have shown that it provides a better coefficient of variation (CV), and that the risk of generating aberrant results is lower (4).

The optional addition of the DNA stain, 7-aminoactinomycin D (7-AAD), which is also included in the kit, makes it possible to exclude dead cells from analysis (1, 2). 7-AAD is only able to diffuse into and stain dead cells, because the cell membrane in these cells is no longer intact.

Principle of the Procedure

CD34Count Kit has been designed to provide an optimal method for CD34+ cell enumeration, following the ISHAGE guidelines for single-platform (1, 2, 5).

The test is performed in duplicate by staining the sample with a dual-colour reagent composed of Anti-Human CD45/FITC and Anti-Human CD34/RPE. After staining of the sample, red blood cells are lysed with an ammonium chloride-based lysing reagent, and 7-AAD is added (optional) to the sample if viability measurement is wanted. Fluorescent count control beads (CytoCount™) are added to the sample for use as an internal reference population.

During analysis, the absolute concentration of CD34+ cells in the sample can be determined by dividing the number of CD34 events by the number of fluorescent bead events, and then multiplying by the bead concentration in CytoCount™.

The principle of the ISHAGE guidelines is to use sequential Boolean gating strategy to define the real progenitor cells with regenerative potential. This is obtained by counter-staining CD34+ cells with Anti-CD45/FITC and thus allowing the elimination of debris and non-specifically stained events from the analysis (1, 2). Importantly, this approach also allows the discrimination between HPCs, which express relatively low levels of CD45 on their surface, and lymphocytes and monocytes, which express high levels. Just as lymphocytes, monocytes, and granulocytes form discrete clusters on bivariate plots of CD45 versus side scatter (SSC), so do non-malignant CD34+ haematopoietic stem and precursor cells (1, 2). The addition of a known concentration of reference beads makes it possible to calculate the absolute concentration of CD34+ cells in the original specimen, i.e. to determine the number of CD34+ cells per μL of specimen.

Exclusion of dead cells from CD34+ cell enumeration is optional and can be achieved by inclusion of the DNA intercalating dye, 7-AAD, which allows discrimination between viable and nonviable cells. 7-AAD is excited at 488 nm and has emission maximum at 660 nm. Addition of 7-AAD is particularly recommended when analysing leukapheresis samples stored for more than four hours or leukapheresis samples analysed after thawing.

Reagents

Materials provided

Vial 1

ANTI-HUMAN CD45/FITC
ANTI-HUMAN CD34/RPE

**Monoclonal Mouse Anti-Human CD45/FITC, Clone T29/33 +
Monoclonal Mouse Anti-Human CD34/RPE, Clone BIRMA-K3**
1 mL, ready to use

Vial 2

EasyLyse™
2 x 5 mL, 20 x concentrated
Erythrocyte-lysing reagent, ammonium chloride based

Vial 3

7-AAD

7-Aminoactinomycin D (7-AAD)
1 mL (0.01% w/v), ready-to-use
For viability staining

Vial 4

CytoCount™
17 mL, ready-to-use after resuspension
Count control beads

Materials required but not provided

1. 12 x 75 mm polystyrene tubes.
2. Calibrated pipette for 10 μL and 100 μL volume.
3. Blood mixer or rotary mixer, for re-suspension of the CytoCount™ beads.
4. Deionized or distilled water.
5. Vortex mixer.
6. Bulk dispenser or pipettor (2 mL) for dispensing 2 mL EasyLyse™.
7. PBS for dilution of specimen if necessary.
8. Sheat Fluid (DakoCytomation code No. S2322).
9. CD34+ control samples (DakoCytomation CD-Chex® CD34, code No. K2358 or K2422).

Reagent Preparation

1. Dilute the required amount of EasyLyse™, Vial 2, 1+19 with deionized water of room temperature. Alternatively mix the contents of one bottle (5 mL) of EasyLyse™ with 95 mL of deionized water of room temperature. Tap water is not compatible with the lysing reagent.
2. Remove Vial 4, CytoCount™, from the 2-8 °C storage. Make sure the cap is tightened to prevent fluid leakage and mix well to ensure complete re-suspension of the beads. Avoid mixing with a vortex mixer owing to the potential introduction of air bubbles that may reduce the actual volume of beads pipetted. It is advisable to place the beads on a rotary mixer for 5-60 minutes to ensure that the beads remain in suspension until required. Allow the CytoCount™ reagent to reach room temperature before use.

Precautions

1. For professional users.
2. Vial 1, Anti-Human CD45/FITC + Anti-Human CD34/RPE, contains material of animal origin. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
3. Do not freeze any of the reagents or expose any of the reagents to direct light.
4. Vial 3, 7-AAD, is a nucleic acid-binding dye. The concentration of dye in the solution is 0.01% and therefore the solution does not require hazard labelling. The toxicological properties of this dye have not been investigated.
5. The concentration of beads in Vial 4, CytoCount™, varies from lot to lot. The bead concentration (C) and standard deviation (S) are stated on the vial as number of beads per μL .
6. Vials 1, 2, 3 and 4 contain sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
7. Ensure that Vial 4, CytoCount™, is stored tightly capped in the upright position to prevent fluid leakage. The CytoCount™ beads must be thoroughly re-suspended before use. Harsh mixing of the CytoCount™ beads on a vortex mixer can introduce air bubbles into the fluid, and this can reduce the expected volume of CytoCount™ beads pipetted. Gentle rotation (e.g. on a rotary mixer or blood tube roller) is recommended.
8. Care must be taken not to lose any of the CytoCount™ suspension before re-suspension; otherwise the bead count becomes invalid. If any leakage from Vial 4, CytoCount™, has occurred upon receiving the product, do not use the beads. Contact DakoCytomations Technical Service for replacement of Vial 4.
9. It is essential to use the same calibrated pipette and the "wet tip" reverse pipetting technique for both the sample and the CytoCount™ beads. It is important that the pipetted volume of the CytoCount™ beads and the sample is accurate. The volumes of the antibody reagent and lysing reagent are not critical in connection with determination of the absolute CD34+ cell count number; it is the ratio between the volume of the sample and the volume of the beads that is important.
10. It is recommended to set the threshold value on FL1 (515-545 nm), since this minimizes the risk of losing CytoCount™ events during acquisition. Care should be taken not to exclude any CD34+ events by setting the FL1 threshold too high. Please refer to Troubleshooting.
11. Testing showed no carry over between two different samples. It is however recommended that each flow cytometer is validated for carry over effect between samples. To avoid any carry over from a sample with a high to a sample with a lower CD34+ cell concentration, PBS can be run through the flow cytometer between samples.
12. Optimal compensation settings are critical when using 7-AAD as a marker for dead cells because the signal from the RPE-channel overlaps into the 7-AAD-channel. In the worst-

case scenario, positive CD34 events will be excluded if they fall into the dead-cell exclusion gate in the 7-AAD vs. Side Scatter (SSC) channel.

13. 7-AAD is excited at 488 nm and has emission maximum at 660 nm (FL3 or FL4, depending on the instrument). Consequently, the dye cannot be used in single-laser systems with other fluorochromes that emit at >600 nm, such as PerCP or RPE-Cy5.
14. Aggregation of count control beads has been reported (4). CytoCount™ beads exhibit an especially low number of multiples (below 3%) making the gating of the beads more simple. If a higher number of CytoCount™ multiples is observed and a problem with the product is suspected, please contact DakoCytomations Technical Services.

Storage

Store the kit at 2-8 °C in the dark. Do not use after expiration date stamped on the kit. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user.

EasyLyse™, Vial 2, is stable for 6 months after opening of the vial. After dilution the lysing reagent is stable for 20 days at 2-24 °C.

Store all reagents in the upright position.

Specimen Collection and Preparation

Collect peripheral blood aseptically by venipuncture into a sterile K₃EDTA blood collection tube. Each test requires 200 µL of sample (100 µL per tube). Follow the collection tube manufacturer's guidelines for sample collection. Collect leukapheresis samples according to the instructions from the manufacturer of the leukapheresis instrument.

Store anti-coagulated blood at room temperature (20 to 25 °C) until ready for staining.

Stain peripheral blood samples within 24 hours of collection. It is recommended to stain leukapheresis samples at the time the leukapheresis product is being processed.

Perform a white blood cell (WBC) count on all specimens to be evaluated. If the WBC count is greater than 10⁷ WBC/mL, dilute the specimen to about 10⁷ WBC/mL with PBS. Record the Dilution Factor for the calculation of the final absolute CD34+ cell count in the original specimen.

Do not use pre-fixed cells.

Staining Procedure

Staining of cells and addition of count control beads

1. Dilute the original specimen to about 10⁷ leucocytes per mL with PBS. Record the accurate Dilution Factor. In most cases, dilution will be required only for leukapheresis samples.
2. Every sample must be run in duplicate. Therefore mark two test tubes for every sample.
3. Pipette 100 µL of the sample into each test tube. Use reverse pipetting (see Guideline, "wet tip" reverse pipetting technique below).
4. Add 10 µL of Vial 1 (Anti-Human CD45/FITC + Anti-Human CD34/RPE) to each tube and mix on a vortex mixer. Incubate the tubes for 30 minutes at 2-8 °C or for 15-30 minutes at room temperature (20-25 °C).
5. Add 2 mL of diluted lysing reagent (Vial 2, EasyLyse™ diluted 20 x). Mix the sample on a vortex mixer immediately after adding the lysing reagent.
6. Incubate in the dark for 10 minutes at room temperature.
7. If viability staining is wanted add 10 µL of Vial 3 (7-AAD) to each sample and mix. Otherwise proceed to step 8. Incubate at least 5 min with 7-AAD before acquisition takes place.
8. Resuspend Vial 4 (CytoCount™) on a rotary mixer as described in Reagent Preparation. Add 100 µL to the stained and lysed sample. Pipetting of both the sample and CytoCount™

beads should be performed with the same calibrated pipette and using a “wet tip” reverse pipetting technique (4) (see Guideline, “wet tip” reverse pipetting technique below).

9. Mix beads and sample gently using a vortex mixer for 3 seconds before acquisition to ensure an even distribution of CytoCount™ beads throughout the sample.
10. Sample acquisition must take place within 45 minutes after the addition of the lysing reagent (step 5).
11. Acquire a minimum of 60 000 white blood cell (WBC) events, 1000 CytoCount™ beads, and a minimum of 100 CD34+ cells (4). Please refer to Acquisition set-up for the CD34Count Kit.

Guideline, “wet tip” reverse pipetting technique

The same pipette should be used to dispense sample and beads. Use a clean pipette tip for each reagent. Adopting the same technique for dispensing both sample and beads will ensure more consistent results.

Sample

1. Press plunger to the second stop, place tip in the fluid and aspirate the sample. Then press the plunger to the first stop dispensing the sample. The pipette tip should now contain excess fluid.
2. Repeat this step twice keeping the pipette tip within the sample.
3. The pipette tip is now ready for use. Press plunger to the **second** stop and place tip in the fluid and aspirate the sample. Carefully remove the pipette tip from the sample and wipe the pipette tip gently with tissue to remove any excess fluid, being careful not to touch the tip orifice and inadvertently removing sample from inside the pipette tip.
4. Try to keep the pipette as vertical as possible. Check for the presence of air bubbles in the tip. If air bubbles are present then dispense the fluid back into the sample and repeat the sampling procedure.
5. Dispense the sample to the **first** plunger stop, residual fluid should be seen in the pipette tip after the fluid has been dispensed. Do not touch the walls of the test tube when removing the tip.

Beads

6. Prepare the pipette with the CytoCount™ bead suspension in Vial 4 as described above for the sample (steps 1-3).
7. For dispensing bead suspension, place the pipette tip on the tube wall near to the top of the sample; slightly angling the tube and pipette will aid this step. Dispense to the **first** plunger stop, residual fluid should be seen in the pipette tip after the fluid has been dispensed.
8. For further pipetting of beads, place the tip in the CytoCount™ Vial and aspirate more bead suspension without dispensing the residual fluid left in the tip after the first pipetting.
9. If the tip has not been in touch with the sample, the residual fluid in the tip should be dispensed into the CytoCount™ Vial. If you choose to discard the residual fluid, there might no longer be reagent for 50 duplicate tests.

Quality Control

Control sample

It is recommended to include a positive control sample as quality control check for a proper CD34+ cell enumeration set-up. DakoCytomation CD-Chex[®] CD34, code No. K2358 or K2422 is recommended as positive control sample. When using CD-Chex[®] CD34, 7-AAD should not be added to the sample, since 7-AAD will stain all cells because the control cells have been fixed. Participation in an external quality assessment scheme is highly recommended.

Time as quality control

Time can be used as an internal quality control check for single-platform determinations, since studies have demonstrated that the number of beads acquired in a fixed time period is remarkably constant for most flow cytometers. Thus for each new batch of beads, the user can derive a mean bead count ± 2 SD range for a given time. Any sample with a bead count outside of this range is indicative of a potential pipetting error and the sample should be re-stained (6).

Duplicate tests

Each specimen must be tested in duplicate. The difference between the values obtained by the duplicate tests should not exceed 15%. Otherwise the sample should be re-tested. The difference between the duplicate values (X and Y) is calculated as follows:

$$\frac{|X-Y|}{(X+Y)/2} \times 100\%$$

Data Acquisition

Follow the manufacturer's recommendations for setting up the cytometer for three-colour acquisition. Set-up should include setting or checking photomultiplier tube (PMT) voltages and instrument sensitivity, as well as compensation, if hardware compensation is used.

Acquisition set-up on FACSCalibur (Beckton Dickinson) and on the Coulter XL (Beckman Coulter) flow cytometers has been described by Sutherland et al. (1) and Gratama et al. (2).

Acquisition set-up for CD34Count Kit

The data can either be acquired with hardware compensation while acquisition takes place, **or** they can be acquired without compensation, which will then be applied during analysis of the data. Please refer to common flow cytometry guidelines regarding compensation set-up.

The following protocol is designed both for acquisition and for analysis.

1. Generate the following two-dimensional data displays (dot plots) and set regions according to the figures:

Plot A: CD45 FITC vs. SSC-H (Region 1 and Region 5)

Plot B: CD34 RPE vs. SSC-H (Region 2)

Plot C: CD45 FITC vs. SSC-H (Region 3)

Plot D: FSC-H vs. SSC-H (Region 4)

Plot E: 7-AAD vs. SSC-H (Region 8)

Plot F: CD45 FITC vs CD34 RPE (Region 6 and Region 9)

Plot G: Time vs. FSC-H gated on the CytoCount™ events (Region 7)

Plot H: FSC-H vs. SSC-H

2. Create the following gate logic (colour is optional):

Name	Expression	Color
G1	NOT R8	
G2	R1 & NOT R8	Green 16 Shades
G3	R1 & R2 & NOT R8	
G4	R1 & R2 & R3 & NOT R8	
G5	R5 & NOT R8	
G6	R6	
Beads	R6 & R7	Blue 16 Shades
Stem Cells	R1 & R2 & R3 & R4 & NOT R8	Red 16 Shades

G7 is named “Stem Cells” and is added in the gate logic builder to colour the positive CD34+ events. The colour gating is very useful during acquisition set-up and analysis.

3. Apply the gates onto the plots as follows

Plot A: G1

Plot B: G2

Plot C: G3

Plot D: G4

Plot E: Ungated

Plot F: Ungated

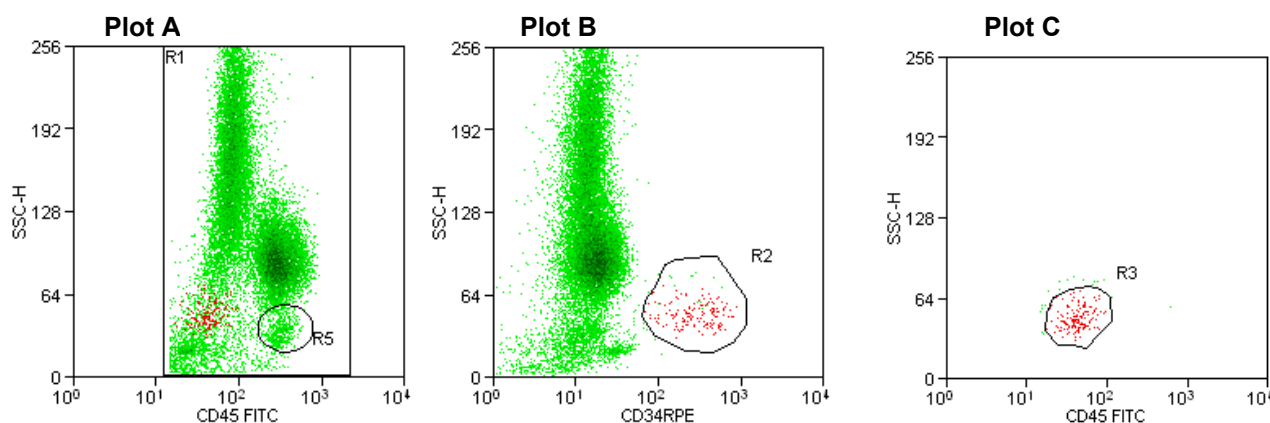
Plot G: G6

Plot H: Ungated

4. Set the threshold value on FL-1 so that it excludes all CD45-negative events. It is recommended to set the threshold value on FL-1, since this minimizes the risk of exclusion of the CytoCount™ beads. Threshold setting on the FSC parameter is feasible, but care should be taken not to exclude any bead events. Please refer to Troubleshooting

5. Load the first sample and adjust the PMT gain for FSC and SSC by looking at Plot H to ensure all populations are on scale. If the threshold is set on the FSC parameter, make sure that the CytoCount™ events are placed over the threshold value.

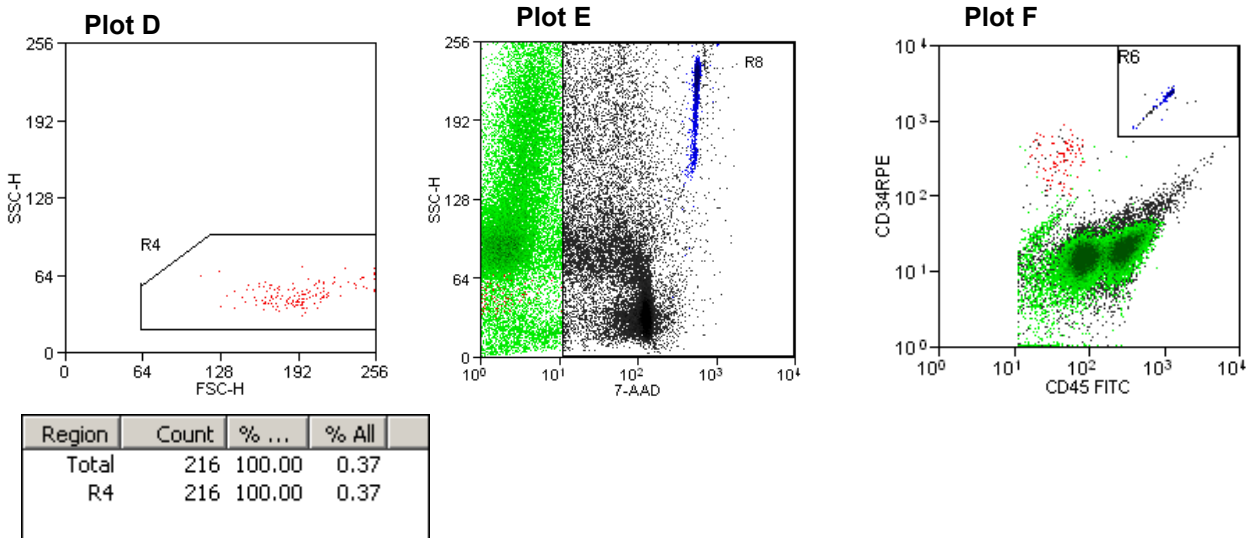
6. Adjust the PMT for CD45/FITC. The lymphocyte population should fall within the third decade (Plot A). Make sure that no dim CD45+ cells are excluded. If in doubt, either lower the FL1 threshold or raise the PMT gain for FL1. If PMT settings are changed, it might be necessary to adjust the compensation settings as well.



7. Adjust the PMT for CD34/RPE. The majority of the negative events should fall between the first and second decade (Plot B).

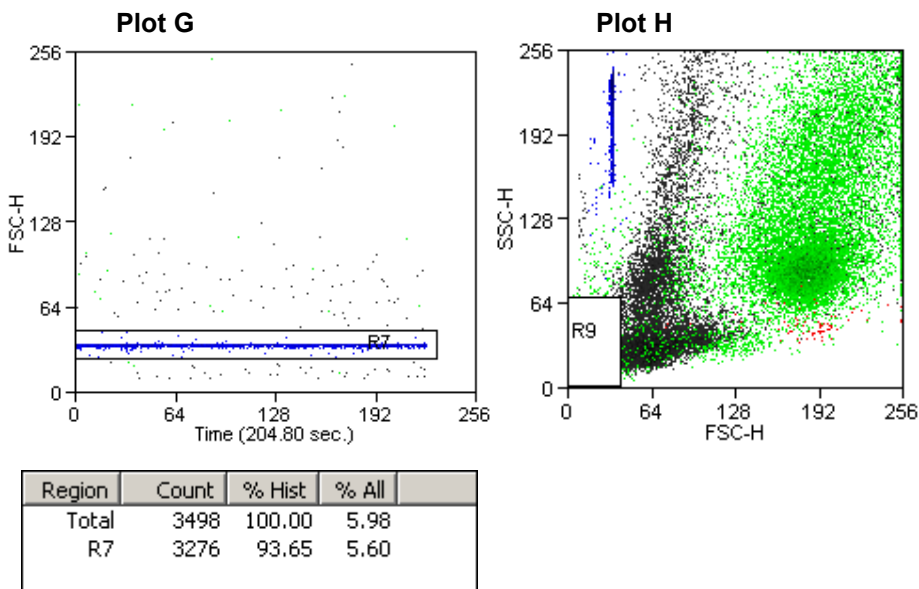
8. Adjust the PMT for 7-AAD. The majority of the negative events should fall within the first decade (Plot E).

9. Apply Region 6 from Plot F in Plot G. If the threshold is set on the FSC parameter, use Plot G to control that no CytoCount™ events have been excluded owing to the threshold setting (refer to Troubleshooting).



10. It is recommended to apply an exclusion gate in Plot H. This exclusion gate shall include the SSC-low and FSC-low events (Region 9). During acquisition the events falling into this gate should be rejected. This is obtained by applying a gate filter (exclusion gate) for these events or by rejecting events in R9 in the acquisition window. When the FSC parameter is used as threshold this exclusion gate is not relevant.

11. Make sure that time is saved as a parameter during acquisition.



The instrument is now ready for acquisition.

12. Acquire at least 60 000 WBC events, 1000 CytoCount™ events and 100 CD34+ events. It is only possible to set a stop criterion for one of these numbers. For low CD34+ samples the 100 CD34+ events will be the stop criterion, while the 60 000 WBC events will be the stop criterion for high CD34+ samples. It is advisable to acquire as many events as feasible, since this will provide the most accurate CD34+ cell number.

Analysis of Data

Use the same protocol for analysis as used for acquisition.

1. Apply compensation setting by following the software instructions for data acquired without hardware compensation. Note that compensation for overlap from the RPE channel into the 7-AAD channel is critical (refer to Precautions).
2. Statistics shall be shown for Region 4 (Stem Cells) showing CD34+ progenitor cells, and for Region 7 (Beads) showing the bead count. Statistics should also be shown for Region 1 (G2), if the number for acquired living CD45-positive cells is required.
3. Import the acquired data file (FCS file) and position the regions.
4. In Plot D apply G5 and position Region 4 to include only the smallest lymphocytes (Figure 1(a)).
5. Apply now G4 in Plot D and keep the Region 4 in the same position (Figure 1(b)).

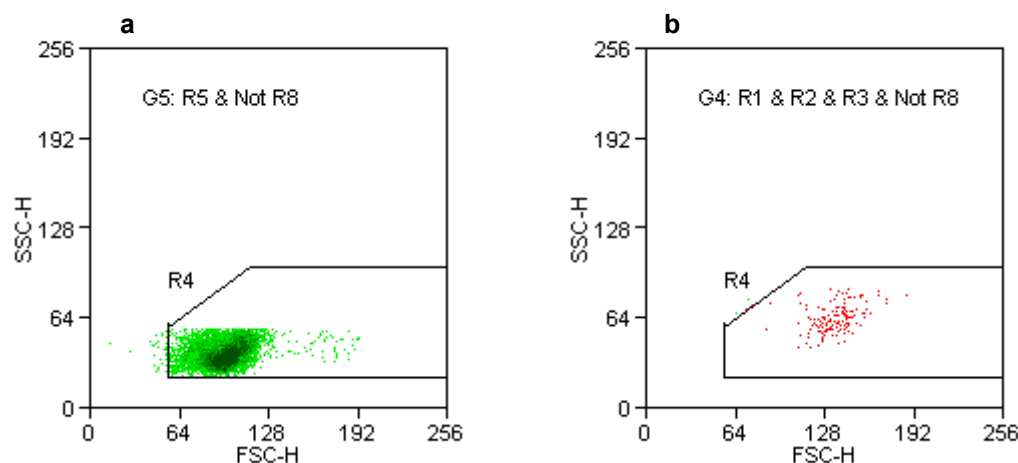


Figure 1. (a): Region 4 is positioned to include events bigger than the smallest lymphocytes as well as events low in Side Scatter. (b): after setting Region 4 on living lymphocytes, the plot is gated on G4 to show those events fulfilling the requirements described in the ISHAGE gating strategy.

Results

Calculation of the absolute CD34+ cell count per μL of the original specimen:

Use the following equation to calculate the absolute CD34+ cell count:

CD34+ Cells/ μL =

$$\frac{\text{Counted Number of CD34+ Cells (R4)} \times \text{Concentration of CytoCount}^{\text{TM}*}}{\text{Counted Number of Beads (R7)}} \times \text{Dilution Factor}$$

*This value (C) is found on the label of Vial 4: C = Number of beads/ μL .

In the example shown (Plots A to H), the absolute CD34+ cell count calculation is as follows:

$$\frac{216 \times 1006}{3276} \times 1 = 66 \text{ CD34+ Cells}/\mu\text{L}$$

The final result is the average of the duplicate tests. DakoCytomation recommends that the difference between these two values does not exceed 15%, otherwise the sample should be analysed again (refer to Quality control).

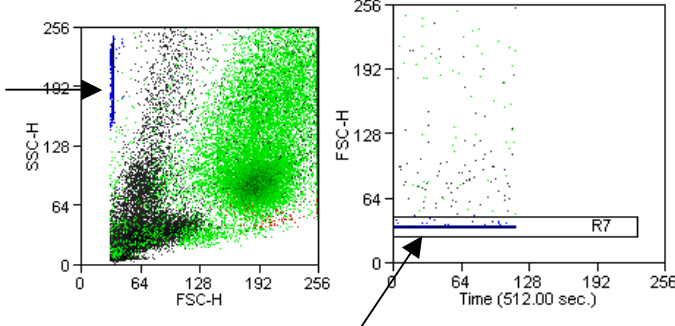
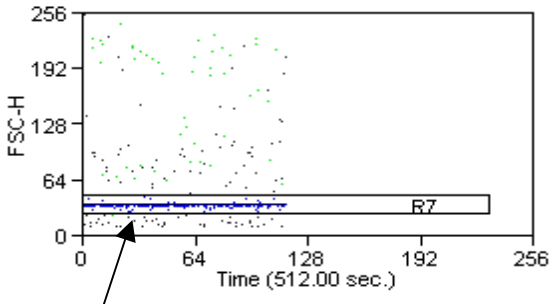
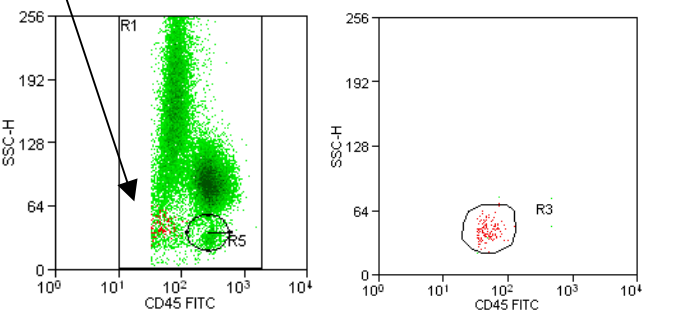
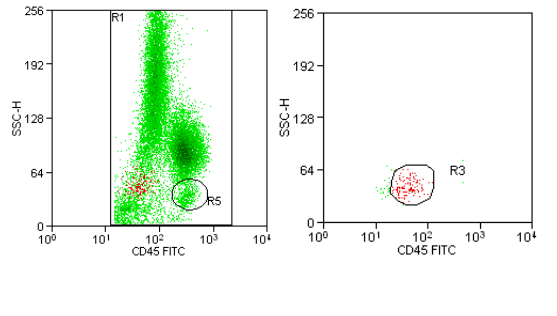
Value Assignment

The bead concentration (C) and corresponding standard deviation (S) is stated on the label of Vial 4 as number/ μL . This number is obtained by using a Coulter Particle Counter Z1. The bead concentration standard deviation is a minor contributor to the combined uncertainty of the analytical result.

Limitations

1. Because of the variability of biological samples, some samples might not be correctly analyzed. An experienced flow cytometrist must critically review all dot plots. An incorrectly high result could lead to an infusate with less than the recommended threshold dose of CD34+ cells.
2. CD34Count Kit results must be interpreted in conjunction with other information available from clinical evaluation and additional diagnostic procedures.
3. Store blood samples at room temperature (20 to 25 °C).
4. Do not use previously fixed and stored patient specimens.
5. The WBC count should not exceed 10^7 WBC/mL and the CD34 cell count should not exceed 2000 cells/ μL in the sample.

Troubleshooting

Problem	Solution
<p>Some bead events are lost because the threshold value on the FSC-H parameter has been set too high.</p>  <p>Wrong: In the FSC-H parameter no events are observed beneath the main bead population. Some CytoCount™ beads have been excluded during acquisition.</p>	<p>Re-run the sample with a lower threshold on FSC-H. However it is recommended to set the threshold on the FL1 parameter.</p>  <p>Correct: Events smaller than the main bead population can be seen. CytoCount™ beads have not been excluded.</p>
<p>Part of the CD34+ population is excluded because the FL1 threshold has been set too high.</p> 	<p>Re-run the sample with a lower FL1 threshold.</p> 
<p>Quality Control Sample is out of range.</p>	<p>Check your flow cytometer and acquisition set-up, and run the Quality Control Sample again. If the control sample is still out of range, contact your local instrument support.</p>
<p>It is difficult to set the regions.</p>	<p>Enlarge the dot plots and reposition the region.</p>

Instrument

CD34Count Kit is intended for use on a flow cytometer. The flow cytometer must be equipped with appropriate computer hardware and software and with a 488 nm laser. The flow cytometer must be capable of detecting fluorescence at the following wavelengths: 515-545 nm (FL1), 562-607 nm (FL2) and >650 nm (FL3 or FL4, depending on the instrument). Also, light scatter (forward and side scatter) must be detectable. The instrument must be able to threshold on either the FL1 or the forward scatter parameter.

Follow the quality control set-up recommended by the instrument manufacturer. Set-up should include setting or checking PMT voltages, fluorescence compensation, and instrument sensitivity.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour usage diagnostique *in vitro* en cytométrie de flux. Le CD34Count Kit est conçu pour être utilisé comme test diagnostique *in vitro* en vue de l'identification et de la numération des cellules souches hématopoïétiques CD34+ présentes dans des échantillons de sang périphérique mobilisé et les échantillons prélevés par leucophérèse.

Résumé et explication

Les progéniteurs hématopoïétiques (PH) peuvent être mobilisés de la moelle osseuse vers le sang périphérique sous l'action de médicaments cytotoxiques, de cytokines ou une association de ces deux substances. Cette mobilisation permet de prélever les PH par aphérèse en quantité suffisante pour les procédures de transplantation (1, 2). L'utilisation de cellules souches du sang périphérique (CSSP) pour les besoins de la transplantation a rapidement augmenté au cours de la dernière décennie et dans le cadre des autotransplantations, le sang périphérique est désormais préféré à la moelle osseuse comme source de CSSP. Traditionnellement, c'est le décompte absolu des cellules mononucléaires recueillies dans la moelle osseuse rapporté au poids du receveur qui était utilisé comme indice de succès probable de la greffe. Cependant, cette approche est insuffisante pour la collecte de CSSP mobilisées du fait de la teneur variable en PH. À la fin des années 1980, on a établi que la quasi-totalité de l'activité des CFC (cellules formant colonies) et du potentiel de greffe des échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique était circonscrite à la petite population de cellules porteuses de l'antigène CD34 (3). Le CD34 est un antigène de surface qui est limité aux progéniteurs les plus précoces sur les cellules hématopoïétiques, pour toutes les lignées (1, 2). Par conséquent, les PH CD34+ peuvent restaurer une hématopoïèse sur plusieurs lignées chez les patients en myélosuppression. Le nombre de cellules CD34+ tel que déterminé en cytométrie de flux par kilogramme de poids corporel du receveur s'avère être l'indicateur le plus utile de la capacité de reconstitution hématopoïétique des greffons de CSSP (1, 2).

Sutherland et al. (5) ont mis au point un ensemble de pratiques cliniques à la demande de la International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (Société internationale de recherche sur l'hémothérapie et les greffes, ISHAGE) pour obtenir une numération simple et normalisée des CD34+. Ces pratiques ont été adoptées lors de la conception du CD34Count Kit ; ce dernier contient de l'Anti-CD45/FITC et de l'Anti-CD34/RPE pour l'identification des leucocytes (CD45+) et la vérification des véritables cellules CD34+ qui présentent une faible fluorescence au réactif CD45 et une faible diffusion latérale (CD45^{dim}, SSC^{low}). L'ajout de billes de comptage CytoCount™ à la suspension cellulaire permet d'établir la concentration en cellules CD34+ par unité de volume originel de l'échantillon (c'est-à-dire le décompte absolu de cellules CD34+) en une seule procédure de cytométrie de flux (technique à plate-forme unique) (1-3). Cette technique présente peu de sources de variabilité par comparaison avec la technique à double plate-forme utilisée auparavant ; des études multicentriques ont par ailleurs établi qu'elle offre un meilleur coefficient de variation (CV) et que le risque de résultats aberrants est plus faible (4).

L'ajout facultatif d'un marqueur ADN, la 7-aminoactinomycine D (7-AAD), également incluse dans le kit, permet d'exclure les cellules mortes de l'analyse (1, 2). La 7-AAD ne peut colorer que les cellules mortes car la membrane cellulaire de celles-ci est endommagée et permet au marqueur de se diffuser dans ces cellules.

Principe de la procédure

Le CD34Count Kit a été conçu pour offrir une méthode optimale de numération des cellules CD34+, conformément aux consignes émises par l'ISHAGE pour une procédure à plate-forme unique (1, 2, 5).

Le test s'effectue en double en colorant l'échantillon avec un réactif bicolore composé d'Anti-CD45 humain/FITC et d'Anti-CD34 humain/RPE. Après coloration de l'échantillon, les globules rouges sont lysés avec un réactif de lyse à base de chlorure d'ammonium et la 7-AAD est ajoutée (facultatif) si une mesure de la viabilité est requise. Des billes fluorescentes de contrôle du comptage (CytoCount™) sont ajoutées à l'échantillon à titre de population de référence interne.

Au cours de l'analyse, la concentration absolue en cellules CD34+ peut être déterminée en divisant le nombre d'événements CD34 par le nombre d'événements billes fluorescentes, puis en multipliant par le taux de billes dans le CytoCount™.

Le principe qui sous-tend les consignes de l'ISHAGE est l'utilisation d'une stratégie de filtrage séquentiel booléen pour définir les véritables progéniteurs présentant un potentiel de régénération. On y parvient en contre-colorant les cellules CD34+ avec l'Anti-CD45/FITC ce qui élimine les débris et les événements de coloration non spécifique de l'analyse (1, 2). Il est important de noter que cette approche permet également de faire la différence entre les PH, qui expriment un niveau relativement faible de CD45 à leur surface, et les lymphocytes et monocytes, qui en expriment de plus grandes quantités. Tout comme les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes forment des grappes discrètes sur les tracés à deux variables du CD45 en fonction de la diffusion latérale (SSC), de même que les cellules souches et les précurseurs hématopoïétiques CD34+ normaux (1, 2). L'ajout des billes de référence à une concentration connue permet de calculer la concentration absolue en cellules CD34+ dans l'échantillon d'origine, c'est-à-dire le nombre de cellules CD34+ par μL d'échantillon.

L'exclusion des cellules mortes de la numération des CD34+ est facultative et peut être obtenue par inclusion d'un marqueur intermédiaire de l'ADN, la 7-AAD, qui permet de faire la différence entre les cellules viables et non viables. La 7-AAD est excitée à 488 nm et atteint son pic d'émission à 660 nm. L'ajout de la 7-AAD est particulièrement recommandé lors de l'analyse d'échantillons prélevés par leucophérèse qui ont été conservés pendant plus de quatre heures ou congelés et décongelés.

Réactifs

Matériels fournis

Flacon 1

ANTI-HUMAN CD45/FITC
ANTI-HUMAN CD34/RPE

**Monoclonal Mouse Anti-Human CD45/FITC, Clone T29/33 +
Monoclonal Mouse Anti-Human CD34/RPE, Clone BIRMA-K3**
1 mL, prêt à l'emploi

Flacon 2

EasyLyse™

2 x 5 mL, concentré à 20 x
Réactif de lyse des érythrocytes, à base de chlorure d'ammonium

Flacon 3

7-AAD

7-Aminoactinomycin D (7-AAD)
1 mL (0,01 % p/v), prêt à l'emploi
Pour coloration de la viabilité

Flacon 4

CytoCount™

17 mL, prêt à l'emploi après remise en suspension
Bille de contrôle du comptage

Matériels requis mais non fournis

1. Tubes en polystyrène 12 x 75 mm.
2. Pipette étalonnée pour 10 µL et 100 µL.
3. Mélangeur de sang ou mélangeur rotatif pour remettre en suspension les billes CytoCount™.
4. Eau déionisée ou distillée.
5. Mélangeur Vortex.
6. Distributeur ou pipeteur de liquide de rinçage (2 mL) pour déposer 2 mL d'EasyLyse™.
7. PBS pour la dilution de l'échantillon si nécessaire.
8. Sheat Fluid (DakoCytomation, réf. S2322).
9. Échantillons de contrôle CD34+ (DakoCytomation CD-Chex® CD34, réf. K2358 ou K2422).

Préparation des réactifs

1. Diluer la quantité requise d'EasyLyse™, flacon 2, à 1+19 avec de l'eau déionisée à température ambiante. Il est également possible de mélanger le contenu d'un flacon (5 mL) d'EasyLyse™ avec 95 mL d'eau déionisée à température ambiante. L'eau du robinet n'est pas compatible avec le réactif de lyse.
2. Sortir le flacon 4, CytoCount™, du lieu de conservation à 2–8 °C. Vérifier que le bouchon est bien fermé pour éviter toute fuite et bien mélanger pour garantir la remise en suspension des billes. Éviter de mélanger dans un mélangeur vortex car cela peut introduire des bulles d'air qui pourraient fausser le volume réel de billes pipetées. Il est conseillé de placer les billes dans un mélangeur rotatif pendant 5 à 60 minutes pour faire en sorte qu'elles demeurent en suspension jusqu'à utilisation. Laisser le réactif CytoCount™ atteindre la température ambiante avant utilisation.

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Le Flacon 1, Anti-Human CD45/FITC + Anti-Human CD34/RPE, contient des produits d'origine animale. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
3. Ne pas congeler les réactifs et ne pas les exposer à une lumière directe.
4. Le flacon 3, 7-AAD, est un colorant qui se lie aux acides nucléiques. La concentration en colorant dans la solution n'est que de 0,01 % et la solution ne doit donc pas être considérée comme un produit dangereux. Les caractéristiques toxicologiques de ce colorant n'ont pas été étudiées.
5. La concentration en billes du flacon 4, CytoCount™, varie d'un lot à l'autre. La concentration en billes (C) et l'écart-type (S) sont indiqués sur le flacon, sous la forme du nombre de billes par µL.
6. Les flacons 1, 2, 3 et 4 contiennent de l'azide de sodium (NaN₃), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
7. Vérifier que le flacon 4, CytoCount™, est bien fermé et conservé en position debout pour éviter toute fuite. Les billes CytoCount™ doivent être remises en suspension en les agitant vigoureusement avant utilisation. Ne pas mélanger les billes CytoCount™ dans un mélangeur vortex car cela peut introduire des bulles d'air qui pourraient diminuer le volume réel de billes CytoCount™ pipetées. Il est plutôt recommandé de procéder à une rotation en douceur (ex. : mélangeur rotatif ou agitateur de tubes de prélèvement).

8. Il faut prendre soin de ne pas perdre les billes CytoCount™ en suspension avant de les remettre en suspension faute de quoi le décompte de billes n'est plus valable. Si le flacon 4, CytoCount™, semble avoir fui à réception du produit, ne pas utiliser les billes. Contacter le Service technique DakoCytomation pour le remplacement du flacon 4.
9. Il est essentiel d'utiliser la même pipette étalonné et la technique de pipetage inversé « à embout mouillé » pour l'échantillon et les billes CytoCount™. Il est très important de pipeter avec précision le volume de billes CytoCount™ et d'échantillon. Les volumes du réactif d'anticorps et du réactif de lyse ne sont pas essentiels pour la détermination du nombre absolu de cellules CD34+ ; c'est le rapport entre le volume de l'échantillon et le volume de billes qui est important.
10. Il est recommandé de fixer la valeur seuil sur FL1 (515-545 nm) pour limiter les risques de manquer des événements CytoCount™ lors de l'acquisition. Il faut prendre soin de ne pas exclure d'événement CD34+ en réglant un seuil FL1 trop élevé. Se reporter à la section Dépannage.
11. Les tests n'ont pas montré d'effet résiduel entre deux échantillons. Il est cependant recommandé de valider chaque cytomètre de flux pour l'absence d'effet résiduel entre les échantillons. Pour éviter tout effet résiduel entre un échantillon avec une forte proportion en CD34+ et un échantillon avec une faible proportion, le cytomètre peut être rincé au PBS entre deux échantillons.
12. Il est essentiel de définir des paramètres de compensation optimaux lors de l'utilisation de l'7-AAD comme marqueur des cellules mortes car le signal provenant du canal RPE se superpose sur celui du canal 7-AAD. Dans le pire des cas, les événements CD34+ peuvent être exclus s'ils tombent dans la fenêtre d'exclusion des cellules mortes du canal 7-AAD / diffusion latérale (SSC).
13. La 7-AAD est excitée à 488 nm et atteint son pic d'émission à 660 nm (FL3 ou FL4, selon l'instrument). Par conséquent, le colorant ne peut pas être utilisé sur les appareil à laser unique avec d'autres fluorochromes émettant à plus de 600 nm, comme le PerCP ou le RPE-Cy5.
14. Une agrégation des billes de contrôle du comptage a été signalée (4). Les billes CytoCount™ présentent un nombre particulièrement réduit de multiples (moins de 3 %) ce qui simplifie le filtrage. Si un nombre supérieur de multiples CytoCount™ est détecté et en cas de suspicion d'un problème avec le produit, contacter le Service technique DakoCytomation.

Conservation

Conserver le kit entre 2 et 8 °C dans l'obscurité. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur l'emballage. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur.

L'EasyLyse™, flacon 2, est stable pendant 6 mois après ouverture du flacon. Après dilution, le réactif de lyse est stable pendant 20 jours entre 2 et 24 °C.

Conserver tous les réactifs en position verticale.

Prélèvement et préparation des échantillons

Prélever le sang périphérique en employant une technique aseptique, par ponction veineuse, dans un tube de prélèvement stérile K₃EDTA. Chaque test requiert 200 µL d'échantillon (100 µL par tube). Suivre les instructions du fabricant des tubes de prélèvement pour la collecte des échantillons. Prélever les échantillons par leucophérèse conformément aux instructions du fabricant de l'appareil de leucophérèse.

Conserver le sang avec l'anticoagulant à température ambiante (20–25 °C) en attendant la coloration.

Les échantillons de sang périphérique doivent être colorés dans les 24 heures suivant le prélèvement. Il est recommandé de colorer les échantillons obtenus par leucophérèse au moment de leur traitement.

Effectuer un décompte des globules blancs sur tous les échantillons. Si le chiffre ainsi obtenu est supérieur à 10^7 globules blancs/mL, diluer l'échantillon à environ 10^7 globules blancs/mL avec du PBS. Enregistrer le facteur de dilution pour le calcul du décompte final absolu de cellules CD34+ dans l'échantillon d'origine.

Ne pas utiliser de cellules préfixées.

Procédure de coloration

Coloration des cellules et ajout des billes de contrôle du comptage

1. Diluer l'échantillon d'origine à environ 10^7 leucocytes par mL avec du PBS. Noter le facteur de dilution exact. Dans la plupart des cas, la dilution n'est nécessaire que pour les échantillons prélevés par leucophérèse.
2. Chaque échantillon doit être testé deux fois. Il faut donc étiqueter deux tubes à essai pour chaque échantillon.
3. Pipeter 100 μ L d'échantillon dans chaque tube à essai. Utiliser le pipetage inversé (voir la Procédure pour la technique de pipetage inversé « à embout mouillé », décrite plus bas).
4. Ajouter 10 μ L du flacon 1 (Anti-Human CD45/FITC + Anti-Human CD34/RPE) dans chaque tube et mélanger au mélangeur vortex. Incuber les tubes pendant 30 minutes entre 2 et 8 °C ou pendant 15 à 30 minutes à température ambiante (20–25 °C).
5. Ajouter 2 mL de réactif de lyse dilué (flacon 2, EasyLyse™ dilué à 20 x). Mélanger l'échantillon sur un mélangeur vortex immédiatement après avoir ajouté le réactif de lyse.
6. Incuber dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante.
7. Si une coloration de viabilité est requise, ajouter 10 μ L du flacon 3 (7-AAD) dans chaque échantillon et mélanger. Sinon, passer à l'étape 8. Incuber au moins 5 minutes avec le 7-AAD avant de procéder à l'acquisition.
8. Remettre en suspension le flacon 4 (CytoCount™) sur un mélangeur rotatif comme décrit à la section Préparation des réactifs. Ajouter 100 μ L à l'échantillon coloré et lysé. Le pipetage de l'échantillon et des billes CytoCount™ doit être effectué à l'aide de la même pipette étalonnée et en employant la technique de pipetage inversé « à embout mouillé » (4) (voir la Procédure pour la technique de pipetage inversé « à embout mouillé », décrite plus bas).
9. Mélanger doucement les billes et l'échantillon avec un mélangeur vortex pendant 3 secondes avant l'acquisition pour assurer une répartition homogène des billes CytoCount™ dans l'échantillon.
10. L'acquisition de l'échantillon doit avoir lieu dans les 45 minutes suivant l'ajout du réactif de lyse (étape 5).
11. Il faut acquérir au moins 60 000 événements globules blancs, 1000 billes CytoCount™ et au moins 100 cellules CD34+ (4). Se reporter à la section Réglage de l'acquisition pour le CD34Count Kit.

Procédure pour la technique de pipetage inversé « à embout mouillé »

La même pipette doit être utilisée pour l'échantillon et les billes. Utiliser un embout propre pour chaque réactif. Le fait d'adopter la même technique pour l'échantillon et les billes permet d'obtenir des résultats plus homogènes.

Échantillon

1. Enfoncer le piston jusqu'au second cran, placer l'embout dans le liquide et aspirer l'échantillon. Enfoncer ensuite le piston jusqu'au premier cran pour déverser l'échantillon. L'embout de la pipette doit contenir une quantité de liquide en trop.
2. Répéter cette étape à deux reprises en gardant le même embout pour l'échantillon.
3. L'embout de la pipette est maintenant prêt à l'emploi. Enfoncer le piston jusqu'au **deuxième** cran, placer l'embout dans le liquide et aspirer l'échantillon. Retirer avec soin l'embout de la pipette de l'échantillon ; essuyer doucement l'embout de la pipette avec un tissu pour éliminer

tout excès de liquide en prenant garde de ne pas toucher l'orifice de l'embout ce qui enlèverait un peu d'échantillon contenu dans l'embout.

4. Essayer de conserver la pipette aussi droite que possible. Vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air dans l'embout. Si tel était le cas, remettre le liquide prélevé dans l'échantillon et recommencer la procédure d'échantillonnage.
5. Verser l'échantillon jusqu'au **premier** cran du piston ; il doit rester un peu de liquide dans l'embout de la pipette. Ne pas toucher les parois du tube à essai lors du retrait de l'embout.

Billes

6. Préparer la pipette avec la suspension de billes CytoCount™ dans le flacon 4 comme décrit ci-dessus pour l'échantillon (étapes 1 à 3).
7. Pour verser la suspension de billes, placer l'embout de la pipette sur la paroi du tube juste au dessus de l'échantillon ; il peut s'avérer utile de pencher légèrement le tube et la pipette à ce stade. Verser jusqu'au **premier** cran du piston ; il doit rester un peu de liquide dans l'embout de la pipette.
8. Pour pipeter plus de billes, placer l'embout dans le flacon CytoCount™ et aspirer la suspension sans verser le reste de liquide présent dans l'embout.
9. Si l'embout n'a pas été en contact avec l'échantillon, le reste de liquide présent dans l'embout peut être reversé dans le flacon CytoCount™. Si vous choisissez de jeter le reste de liquide, il n'y aura plus assez de réactif pour 50 tests en double.

Contrôle qualité

Échantillon de contrôle

Il est recommandé d'inclure un échantillon de contrôle positif comme témoin de contrôle qualité pour le paramétrage de la numération des cellules CD34+. Le DakoCytomation CD-Chex® CD34, réf. K2358 ou K2422 est recommandé comme échantillon de contrôle positif. Lors de l'utilisation du CD-Chex® CD34, il ne faut pas ajouter de 7-AAD à l'échantillon car, étant donné que les cellules ont été fixées, elle colorerait toutes les cellules.

L'inclusion dans un programme externe d'évaluation de la qualité est hautement recommandée.

Le temps comme contrôle qualité

Le temps peut être utilisé comme vérificateur du contrôle qualité interne pour les tests à plate-forme unique car les études ont démontré que le nombre de billes acquises sur un laps de temps déterminé est constant sur la plupart des cytomètres de flux. Par conséquent, pour chaque nouveau lot de billes, l'utilisateur peut calculer la plage moyenne du nombre de billes ± 2 ET pour un laps de temps donné. Tout échantillon dont le nombre de billes se situe en dehors de cette plage peut être le signe d'une erreur de pipetage et l'échantillon doit être recoloré (6).

Tests en double

Chaque échantillon doit être testé en double. La différence entre les valeurs obtenues lors des deux tests ne doit pas dépasser 15 %. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être retesté.

La différence entre les deux valeurs (X et Y) se calcule comme suit :

$$\frac{|X-Y|}{(X+Y)/2} \times 100 \%$$

Acquisition des données

Suivre les recommandations du fabricant pour le réglage du cytomètre pour l'acquisition tricolore. Le réglage doit inclure le paramétrage ou la vérification des tensions du tube photomultiplicateur (PMT) et de la sensibilité de l'instrument, ainsi que la compensation, si elle est utilisée.

Le réglage de l'acquisition sur les cytomètres de flux FACSCalibur (Beckton Dickinson) et Coulter XL (Beckman Coulter) a été décrit par Sutherland et al. (1) et Gratama et al. (2).

Réglage de l'acquisition pour le CD34Count Kit

Les données peuvent être acquises soit par compensation au moment de l'acquisition, **soit** sans compensation, celle-ci étant alors appliquée au moment de l'analyse des données. Se reporter aux instructions courantes concernant la cytométrie pour le réglage de la compensation.

Le protocole suivant est conçu pour l'acquisition et l'analyse.

1. Générer les tracés de données bidimensionnels suivants (graphique à points) et déterminer les régions par groupe en fonction des chiffres :

Graphique A : CD45 FITC et SSC-H (Région 1 et Région 5)

Graphique B : CD34 RPE et SSC-H (Région 2)

Graphique C : CD45 FITC et SSC-H (Région 3)

Graphique D : FSC-H et SSC-H (Région 4)

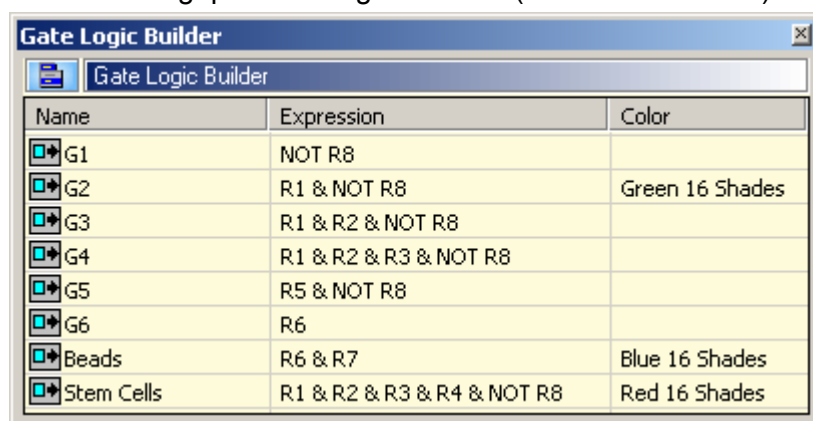
Graphique E : 7-AAD et SSC-H (Région 8)

Graphique F : CD45 FITC et CD34 RPE (Région 6 et Région 9)

Graphique G : Temps et FSC-H filtrés en fonction des événements CytoCount™ (Région 7)

Graphique H : FSC-H et SSC-H

2. Créer la logique de filtrage suivante (couleur facultative) :



Name	Expression	Color
G1	NOT R8	
G2	R1 & NOT R8	Green 16 Shades
G3	R1 & R2 & NOT R8	
G4	R1 & R2 & R3 & NOT R8	
G5	R5 & NOT R8	
G6	R6	
Beads	R6 & R7	Blue 16 Shades
Stem Cells	R1 & R2 & R3 & R4 & NOT R8	Red 16 Shades

G7 est dénommé « Stem Cells » et ajouté au modèle logique de filtrage pour la coloration des événements CD34+ positifs. Le filtrage couleur est très utile pour le paramétrage et l'analyse de l'acquisition.

3. Appliquer les filtres sur les graphiques comme suit :

Graphique A : G1

Graphique B : G2

Graphique C : G3

Graphique D : G4

Graphique E : Sans filtre

Graphique F : Sans filtre

Graphique G : G6

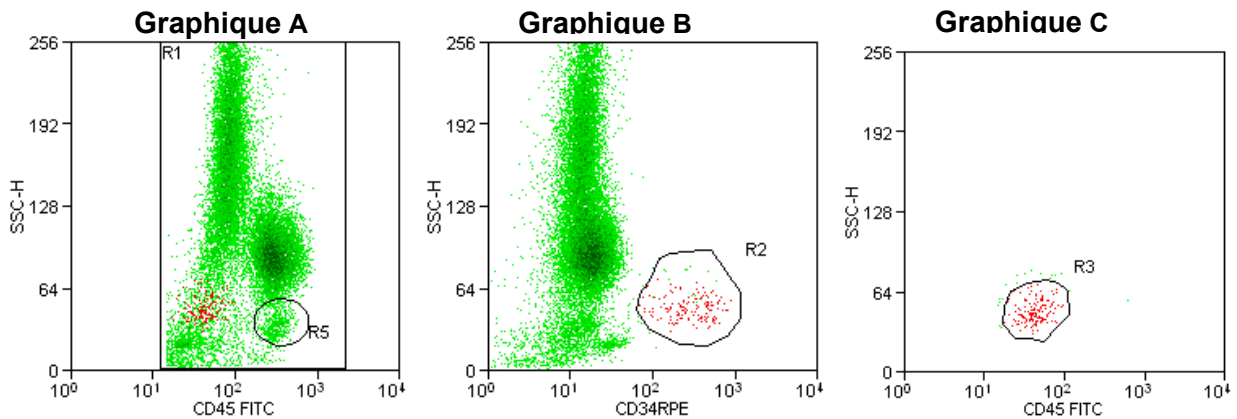
Graphique H : Sans filtre

4. Régler le seuil sur FL-1 pour exclure tous les événements CD45 négatifs. Il est recommandé de régler le seuil sur FL-1 pour réduire le risque d'exclusion des événements CytoCount™. Le réglage du seuil pour le paramètre FSC est possible mais il faut prendre soin de ne pas exclure un événement billes. Consulter la section Dépannage.

5. Charger le premier échantillon et régler le gain du PMT pour FSC et SSC en vérifiant sur le graphique H que toutes les populations sont à l'échelle. Si le seuil a été défini pour le paramètre FSC, vérifier que les événements CytoCount™ se situent au-delà de la valeur seuil.

6. Régler le PMT pour CD45/FITC. La population lymphocytaire doit se situer dans la troisième décade (graphique A). Vérifier qu'aucune cellule CD45+ faible n'est exclue. En cas de doute,

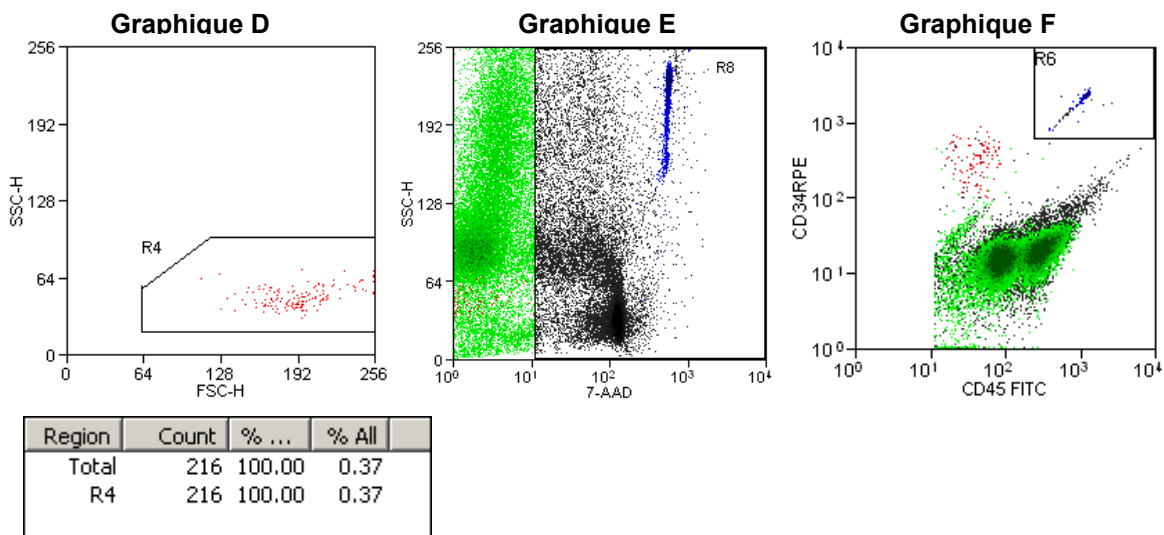
il faut soit réduire le seuil FL1 ou relever le gain PMT pour FL1. Si les paramètres PMT sont modifiés, il peut être nécessaire de régler la compensation aussi.



7. Régler le PMT pour CD34/RPE. La majorité des événements négatifs doivent se situer entre la première et la deuxième décade (graphique B).

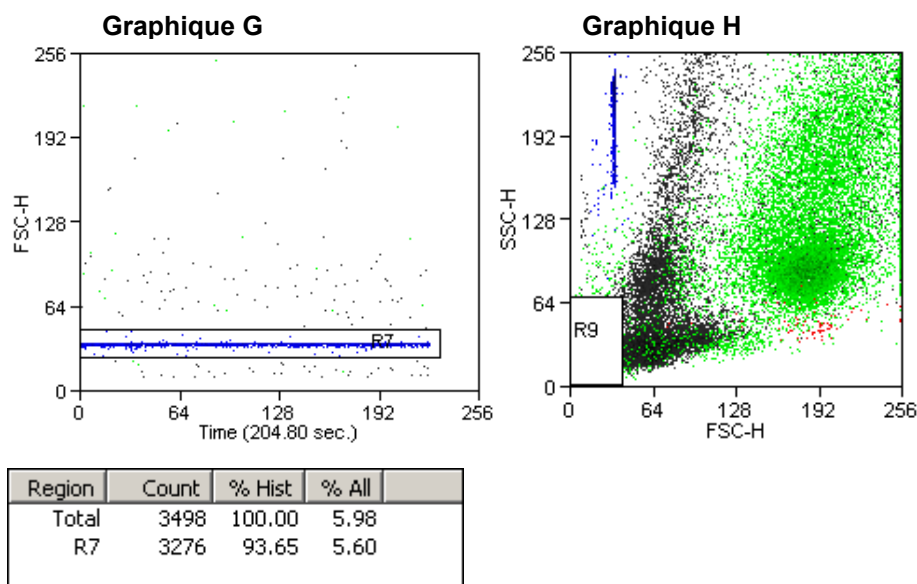
8. Régler le PMT pour 7-AAD. La majorité des événements négatifs doivent se situer dans la première décade (graphique E).

9. Appliquer la région 6 du graphique F au graphique G. Si le seuil est défini pour le paramètre FSC, utiliser le graphique G pour vérifier qu'aucun événement CytoCount™ n'a été exclu en raison du paramétrage du seuil (voir la section Dépannage).



10. Il est recommandé d'appliquer un filtre au graphique H. Ce filtre doit inclure les événements SSC-low et FSC-low (région 9). Au cours de l'acquisition, les événements qui tombent dans cette fenêtre doivent être rejetés. Pour ce faire, appliquer un filtre (fenêtre d'exclusion) pour ces événements ou rejeter les événements en R9 dans la fenêtre d'acquisition. Lorsque le paramètre FSC est utilisé comme seuil, cette fenêtre d'exclusion n'est pas pertinente.

11. Vérifier que le temps est enregistré comme paramètre au cours de l'acquisition.



L'instrument est à présent prêt pour l'acquisition.

12. Acquérir au moins 60 000 événements globules blancs, 1 000 événements CytoCount™ et 100 événements CD34+. Il est possible de définir un critère d'arrêt pour seulement une de ces trois valeurs. Pour les échantillons à faible teneur en CD34+, les 100 événements CD34+ constituent le critère d'arrêt tandis que les 60 000 événements globules blancs constituent le critères d'arrêt pour les échantillons à teneur élevée en CD34+. Il est conseillé d'acquérir autant d'événements que possible car cela permet d'obtenir la numération la plus précise de cellules CD34+.

Analyse des données

Utiliser le même protocole pour l'analyse que pour l'acquisition.

1. Appliquer le réglage de compensation en suivant les instructions du logiciel pour les données acquises sans compensation. Il faut noter que la compensation pour la superposition du canal RPE sur le canal 7-AAD est essentielle (voir la section Précautions).
2. Les statistiques doivent s'afficher pour la région 4 (cellules souches) en présentant les progéniteurs CD34+ et pour la région 7 (billes) en présentant le décompte de billes. Les statistiques doivent également s'afficher pour la région 1 (G2) si le nombre de cellules CD45+ vivantes acquises est demandé.
3. Importer le fichier de données acquises (fichier FCS) et positionner les régions.
4. Dans le graphique D, appliquer G5 et positionner la région 4 pour inclure seuls les plus petits lymphocytes (illustration 1(a)).
5. Appliquer à présent G4 dans le graphique D et garder la région 4 dans la même position (illustration 1(b)).

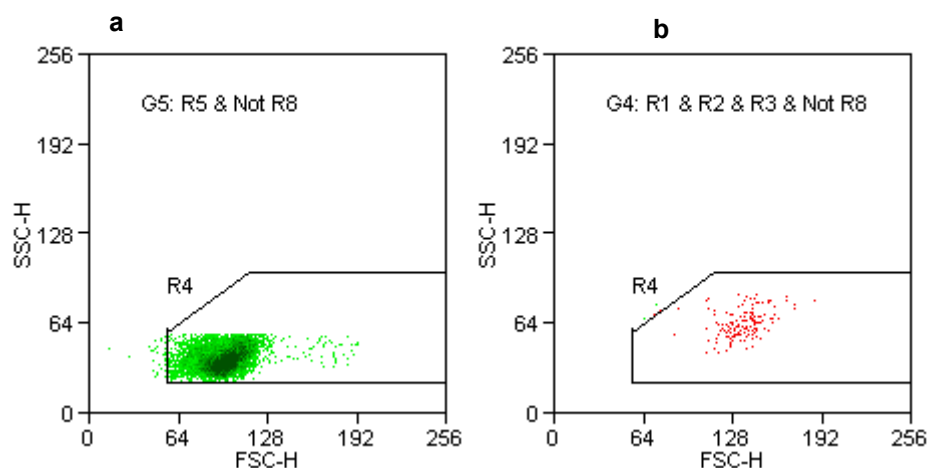


Illustration 1. (a) : La région 4 est positionnée pour inclure des événements plus grands que les plus petits lymphocytes ainsi que des événements présentant une faible diffusion latérale. (b) : après avoir réglé la région 4 sur les lymphocytes vivants, le filtre G4 est appliqué au graphique pour afficher ces événements répondant aux critères décrits dans la stratégie de filtrage ISHAGE.

Résultats

Calcul du décompte absolu de cellules CD34+ par µL d'échantillon d'origine :

Utiliser l'équation suivante pour calculer le décompte absolu de cellules CD34+ :

Cellules CD34+/µL =

$$\frac{\text{Nombre de cellules CD34+ comptées (R4)} \times \text{Concentration du CytoCount}^{\text{TM}*}}{\text{Nombre de billes comptées (R7)}} \times \text{Facteur de dilution}$$

*Cette valeur (C) est indiquée sur l'étiquette du flacon 4 : C = nombre de billes/µL.

Dans l'exemple affiché (graphiques A à H), le décompte absolu de cellules CD34+ est le suivant :

$$\frac{216 \times 1006}{3276} \times 1 = 66 \text{ cellules CD34+ /}\mu\text{L}$$

Le résultat final est la moyenne des tests en double. DakoCytomation recommande de ne pas dépasser 15 % de différence entre ces deux valeurs ; si tel était le cas, l'échantillon devrait être analysé à nouveau (voir la section Contrôle qualité).

Affectation des valeurs

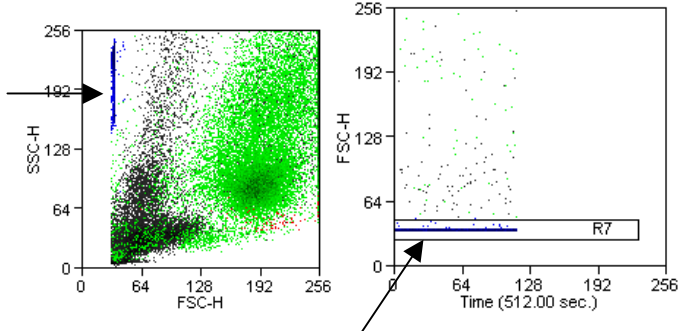
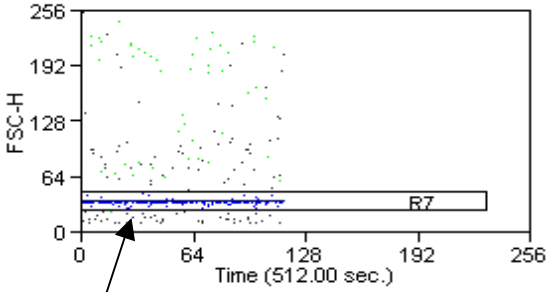
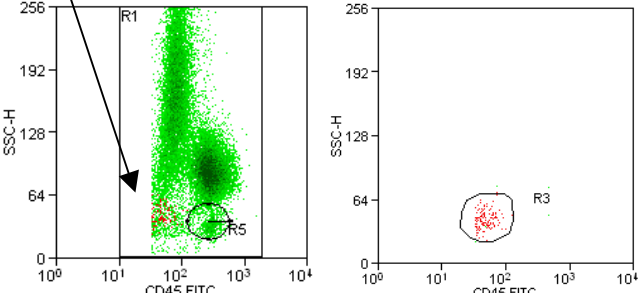
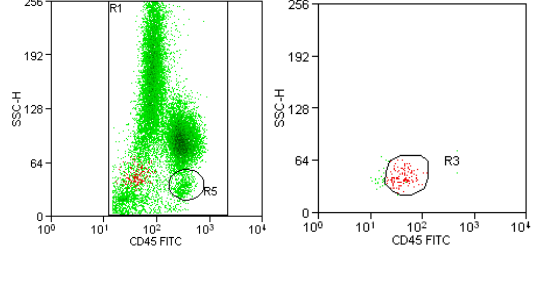
La concentration en billes (C) et l'écart-type correspondant (S) figurent sur l'étiquette du flacon 4 sous la forme nombre/µL. Cette valeur a été obtenue à l'aide d'un compteur de particules Coulter Z1. L'écart-type de la concentration en billes n'a qu'un faible impact sur l'incertitude totale du résultat analytique.

Limites

1. Du fait de la variabilité des échantillons biologiques, certains échantillons peuvent ne pas être analysés correctement. Un technicien expérimenté en cytométrie de flux doit examiner attentivement tous les graphiques à points. Un résultat trop élevé peut générer un infusât contenant une quantité de cellules CD34+ inférieure au seuil recommandé.
2. Les résultats du CD34Count Kit doivent être interprétés en association avec les autres informations cliniques disponibles et les autres procédures diagnostiques.

3. Conserver les échantillons sanguins à température ambiante (entre 20 et 25 °C).
4. Ne pas utiliser d'échantillons de patient déjà fixés et conservés.
5. La numération des globules blancs ne doit pas dépasser 10^7 globules blancs/mL et celle des cellules CD34 ne doit pas dépasser 2 000 cellules/ μ L dans l'échantillon.

Dépannage

Problème	Solution
<p>Certains événements billes sont perdus car la valeur seuil du paramètre FSC-H est trop élevée.</p>  <p>Erreur : Dans le paramètre FSC-H, aucun événement n'est observé sous la population principale de billes. Certaines billes CytoCount™ ont été exclues au cours de l'acquisition.</p>	<p>Retester l'échantillon avec un seuil FSC-H plus bas. Cependant, il est recommandé de régler le seuil du paramètre FL1.</p>  <p>Correct : Les événements plus petits que la population principale de billes sont visualisés. Les billes CytoCount™ n'ont pas été exclues.</p>
<p>Une partie de la population CD34+ est exclue car le seuil FL1 est trop élevé.</p> 	<p>Retester l'échantillon avec un seuil FL1 plus bas.</p> 
<p>L'échantillon de contrôle qualité est hors plage.</p>	<p>Vérifier le réglage du cytomètre et de l'acquisition et retester l'échantillon de contrôle qualité. S'il est toujours hors plage, contacter le service d'assistance technique local.</p>
<p>Il est difficile de régler les régions.</p>	<p>Élargir les graphiques de points et repositionner la région.</p>

Instrument

CD34Count Kit est conçu pour être utilisé sur un cytomètre de flux. Le cytomètre de flux doit être équipé du matériel informatique et du logiciel appropriés, et d'un laser 488 nm. Le cytomètre de flux doit pouvoir détecter une fluorescence aux longueurs d'onde suivantes : 515–545 nm (FL1), 562–607 nm (FL2) et >650 nm (FL3 ou FL4, selon l'instrument). La diffusion lumineuse (diffusion

vers l'avant, FSC, et latérale, SSC) doit également être détectée. L'instrument doit pouvoir établir un seuil : FL1 ou diffusion latérale.

Suivre les recommandations du fabricant de l'instrument en ce qui concerne le paramétrage du contrôle qualité. Le paramétrage doit inclure le réglage ou la vérification des tensions du PMT, de la compensation de la fluorescence et de la sensibilité de l'instrument.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik mittels Durchflusszytometrie. Das CD34Count Kit ist für den In-vitro-Nachweis und die Auszählung CD34-positiver (CD34+) hämatopoetischer Stammzellen in Proben mobilisierten humanen peripheren Bluts und in Leukophoreseproben bestimmt.

Zusammenfassung und Erklärung

Hämatopoetische Vorläuferzellen (haematopoietic progenitor cells = HPC) im Knochenmark können durch zytotoxische Arzneimittel, Zytokine oder Kombinationen mobilisiert werden und ins periphere Blut (PB) gelangen. Diese Mobilisierung ermöglicht die Gewinnung von HPCs durch Apherese in für Transplantationsverfahren ausreichender Menge (1, 2). Die Verwendung von Stammzellen aus dem peripheren Blut für Transplantationszwecke hat im letzten Jahrzehnt rapide zugenommen, und für autologe Transplantationen werden diese HPCs den aus dem Knochenmark (KM) gewonnenen Stammzellen inzwischen vorgezogen. In der Vergangenheit wurde der absoluten Anzahl aus dem Knochenmark gewonnener mononukleärer Zellen in Relation zum Körpergewicht des Empfängers eine hohe Aussagekraft hinsichtlich des Verpflanzungspotenzials beigemessen. Aufgrund des unterschiedlichen HPC-Gehalts eignet sich dieses Verfahren allerdings nicht für aus peripherem Blut gewonnene mobilisierte Stammzellen. Gegen Ende der Achtziger Jahre wurde nachgewiesen, dass die kleine Population der das CD34-Antigen (3) tragenden Zellen praktisch für die gesamte Aktivität koloniebildender Zellen und das Verpflanzungspotenzial von Proben aus Knochenmark oder peripherem Blut verantwortlich ist. CD34 ist ein bei den hämatopoetischen Zellen auf frühe Vorläuferzellen aller Zelllinien beschränktes Zelloberflächenantigen (1, 2). Daher können CD34-positiv hämatopoetische Stammzellen bei Patienten mit Myeloablation die Hämatopoese multipler Zelllinien wieder herstellen. Die Anzahl der mittels Durchflusszytometrie bestimmten CD34-positiven Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers hat sich als der nützlichste Indikator für die hämatopoetische Rekonstitutionsfähigkeit von Stammzell-Transplantaten aus peripherem Blut erwiesen (1, 2).

Sutherland et al. (5) haben für die „International Society for Hematotherapy and Graft Engineering“ (Internationale Gesellschaft für Hämotherapie und Transplantationstechnik, ISHAGE) eine Reihe klinischer Richtlinien formuliert. Das CD34Count Kit, das Anti-CD45/FITC und Anti-CD34/RPE enthält und aufgrund des Abblendens der CD45-Fluoreszenz sowie einer geringen seitlichen Streuung (CD45^{dim}, SSC^{low}) den Nachweis von Leukozyten (CD45+) und die Verifizierung „echter“ CD34-positiver Zellen ermöglicht, basiert auf diesen Richtlinien. Die Zugabe von CytoCount™ Zählperlen zur Zellsuspension ermöglicht die Bestimmung der dem ursprünglichen Volumen der Probe entsprechenden Konzentration an CD34+ Zellen pro Einheit (also die absolute Anzahl der CD34-positiven Zellen) mit einer einzigen durchflusszytometrischen Messung (Single-Plattform-Technik) (1-3). Bei der Single-Plattform-Technik sind die Unterschiede geringer als bei der früher allgemein verbreiteten Dual-Plattform-Technik, und in multizentrischen Studien wurde aufgezeigt, dass mit dieser Technik ein besserer Variationskoeffizient (VK) und ein geringeres Risiko abweichender Ergebnisse verbunden ist (4).

Durch Zugabe des ebenfalls im Kit enthaltenen DNA-Farbstoffs 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) können abgestorbene Zellen aus der Analyse ausgegrenzt werden (1, 2). 7-AAD kann nur in abgestorbene Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, diffundieren und diese färben.

Verfahrensprinzip

Das CD34Count Kit wurde mit dem Ziel entwickelt, ein optimales Verfahren für die Auszählung CD34-positiver Zellen nach den ISHAGE-Richtlinien für Single-Plattform-Verfahren zur Verfügung stellen zu können (1, 2, 5).

Der Test wird doppelt durchgeführt und umfasst eine Färbung der Probe mit einem aus Anti-Human CD45/FITC und Anti-Human CD34/RPE bestehenden Reagenz zur Zweifachfärbung. Nach dem Einfärben der Probe werden die roten Blutkörperchen mit einem Lysierungsreagenz auf Ammoniumchloridbasis lysiert. Zur Messung der Lebensfähigkeit kann ggf. 7-ADD zugesetzt werden. Als interne Bezugspopulation werden der Probe fluoreszierende Kontroll-Zählperlen (CytoCount™) zugegeben.

Die absolute Konzentration CD34-positiver Zellen in der Probe kann während der Analyse durch Division der Anzahl der CD34-Ereignisse durch die Anzahl der Ereignisse der fluoreszierenden Perlen und anschließende Multiplikation mit der Perlenkonzentration in CytoCount™ ermittelt werden.

Das Prinzip der ISHAGE-Richtlinien besteht in der Verwendung der sequenziellen Boole'schen Gating-Strategie, um echte Vorläuferzellen mit regenerativem Potenzial zu ermitteln. Dieses wird durch die Gegenfärbung CD34-positiver Zellen mit Anti-CD45/FITC zum Ausschluss von Fremdkörpern und unspezifisch gefärbten Ereignissen aus der Analyse erreicht (1, 2).

Ausschlaggebend ist, dass dieses Vorgehen auch die Unterscheidung zwischen hämatopoetischen Stammzellen, die auf ihrer Oberfläche nur relativ niedrige Mengen CD45 exprimieren, und den große Mengen exprimierenden Lymphozyten und Monozyten gestattet. Nicht-maligne CD34-positive hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen bilden ebenso wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten verglichen mit der seitlichen Streuung (SSC) auf bivariaten CD45-Plots separate Cluster (1, 2). Die Zugabe einer bekannten Konzentration von Bezugsperten ermöglicht die Berechnung der absoluten CD34+ Konzentration in der Ursprungsprobe, also die Bestimmung der Anzahl der CD34-positiven Zellen pro μL der Probe.

Der Ausschluss abgestorbener Zellen aus der Zählung der CD34-positiven Zellen ist optional und kann durch Zwischenschalten der DNA-Färbung mit 7-ADD erreicht werden, die eine Differenzierung zwischen lebensfähigen und nicht-lebensfähigen Zellen ermöglicht. 7-AAD wird bei 488 nm stimuliert und erreicht sein Emissionsmaximum bei 660 nm. Die Zugabe von 7-AAD wird besonders dann empfohlen, wenn Leukaphereseproben länger als 4 Stunden aufbewahrt bzw. aufgetaute Leukaphereseproben analysiert werden.

Reagenzien

Mitgelieferte Materialien

Fläschchen 1

ANTI-HUMAN CD45/FITC
ANTI-HUMAN CD34/RPE

**Monoclonal Mouse Anti-Human CD45/FITC, Clone T29/33 +
Monoclonal Mouse Anti-Human CD34/RPE, Clone BIRMA-K3**
1 mL, gebrauchsfertig

Fläschchen 2

EasyLyse™

2 x 5 mL, 20fach konzentriert
Erythrozyten-Lysierungsreagenz auf Ammoniumchloridbasis

Fläschchen 3

7-AAD

7-Aminoactinomycin D (7-AAD)
1 mL (0,01% w/v), gebrauchsfertig
Für die Färbung auf Lebensfähigkeit

Fläschchen 4

CytoCount™

17 mL, gebrauchsfertig nach Resuspension
Zählkontrollperlen

Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material

1. 12 x 75 mm Polystyrol-Röhrchen.
2. Kalibrierte Pipette für 10 μL und 100 μL .

3. Blutmischgerät oder Drehrührwerk für die Resuspension der CytoCount™ Perlen.
4. Entionisiertes oder destilliertes Wasser.
5. Vortexer.
6. Großdispenser oder Pipettor (2 mL) zum Dispensieren von 2 mL EasyLyse™.
7. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) zum Verdünnen der Probe bei Bedarf.
8. Sheath Fluid (DakoCytomation Code Nr. S2322).
9. CD34+ Kontrollproben (DakoCytomation CD-Chex® CD34, Code Nr. K2358 oder K2422).

Reagenzvorbereitung

1. Die benötigte Menge EasyLyse™, Fläschchen 2, 1:19 mit entionisiertem Wasser (Raumtemperatur) verdünnen. Wahlweise kann der Inhalt einer Flasche (5 mL) EasyLyse™ mit 95 mL zimmerwarmem entionisiertem Wasser verdünnt werden. Leitungswasser ist mit dem Lysierungsreagenz nicht kompatibel.
2. Das CytoCount™ enthaltende Fläschchen 4 aus der Kühlung bei 2–8 °C entnehmen. Der Deckel muss fest zuge dreht sein, damit keine Flüssigkeit auslaufen kann, dann gut mischen, um die vollständige Resuspension der Perlen zu gewährleisten. Das Mischen auf einem Vortexer vermeiden, da sich dadurch Luftblasen bilden können, die dann das Volumen der tatsächlich pipettierten Perlen verringern. Um zu gewährleisten, dass die Perlen bis zum Verbrauch in Suspension bleiben, wird empfohlen, die Perlen 5–60 Minuten lang auf ein Drehrührwerk zu stellen. Das CytoCount™ Reagenz vor Verwendung Raumtemperatur annehmen lassen.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Fläschchen 1, Anti-human-CD45/FITC und Anti-human-CD34/RPE, enthält Material tierischen Ursprungs. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs muss auch dieses entsprechend gehandhabt werden.
3. Reagenzien nicht einfrieren und keiner direkten Lichteinwirkung aussetzen.
4. Fläschchen 3 enthält 7-AAD, einen nukleinsäurebindenden Farbstoff. Die Konzentration des Farbstoffs in der Lösung beträgt nur 0,01 %, so dass eine Kennzeichnung der Lösung als Gefahrstoff nicht erforderlich ist. Die toxikologischen Eigenschaften dieses Farbstoffs sind allerdings noch nicht erforscht worden.
5. Die Konzentration der Perlen in Fläschchen 4, CytoCount™, variiert von Charge zu Charge. Die Perlenkonzentration (C) und die Standardabweichung (S) sind auf dem Fläschchen als Anzahl Perlen pro µL angegeben.
6. Die Fläschchen 1, 2, 3 und 4 enthalten Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
7. Fläschchen 4 mit CytoCount™ muss aufrecht und fest verschlossen aufbewahrt werden, um ein Auslaufen von Flüssigkeit zu verhindern. Die CytoCount™ Perlen müssen vor der Verwendung gründlich resuspendiert werden. Heftiges Mischen der CytoCount™ Perlen auf einem Vortexer kann zum Einbringen von Luftblasen in die Flüssigkeit führen, die die erwartete Menge pipettierter CytoCount™ Perlen vermindern. Vorsichtige Drehbewegungen (z.B. auf einem Drehrührwerk oder einer Roller-Einrichtung für Blutprüf Röhrchen) werden empfohlen.
8. Es ist sorgfältig darauf zu achten, dass vor der Resuspension keine CytoCount™ Suspension verloren geht, da die Perlenanzahl ansonsten nicht mehr zutreffend ist. Falls nach Erhalt des Produkts Flüssigkeit aus Fläschchen 4, CytoCount™, ausgelaufen ist, die

Perlen nicht mehr verwenden. Den technischen Kundendienst von DakoCytomation verständigen, um Ersatz für Fläschchen 4 zu erhalten.

9. Für die Probe und die CytoCount™ Perlen unbedingt dieselbe kalibrierte Pipette und ein einheitliches Reverse-Pipettierungs-Verfahren „mit vorbefeuchteter Spitze“ verwenden. Für die CytoCount™ Perlen und die Probe ist ein exakt pipettiertes Volumen unerlässlich. Die Volumina der Antikörper- und Lysierungsreagenzien sind bei der Bestimmung der absoluten Anzahl CD34-positiver Zellen nicht so wichtig, entscheidend ist allein das Verhältnis zwischen dem Probenvolumen und dem Volumen der Perlen.
10. Empfohlen wird ein Schwellenwert bei FL1 (515–545 nm), da dieser das Risiko des Verlustes von CytoCount™ Ereignissen während der Erfassung minimiert. Es dürfen keine CD34-positiven Ereignisse aufgrund einer zu hohen FL1-Schwelle verloren gehen. Bitte den Abschnitt „Fehlersuche und -behebung“ beachten.
11. Tests haben bei zwei verschiedenen Proben keine Einschleppung ergeben. Dennoch wird empfohlen, jedes Durchflusszytometer zwischen zwei Proben auf eventuelle Einschleppungen zu überprüfen. Um eine Einschleppung von einer Probe mit einer hohen Konzentration CD34-positiver Zellen in eine Probe mit einer niedrigen Konzentration zu vermeiden, kann zwischen zwei Proben ein Durchlauf mit PBS vorgenommen werden.
12. Bei Verwendung von 7-AAD als Marker für abgestorbene Zellen sind optimale Abgleicheinstellungen entscheidend, da das Signal des RPE-Kanals sich mit dem des 7-AAD-Kanals überschneidet. Schlimmstenfalls können positive CD34-Ereignisse ausgeschlossen werden, die in das Ausschluss-Gate für abgestorbene Zellen des 7-AAD-Kanals verglichen mit dem Kanal für seitliche Streuung fallen.
13. 7-AAD wird bei 488 nm stimuliert und erreicht sein Emissionsmaximum bei 660 nm (je nach Gerät FL3 oder FL4). Aus diesem Grund kann der Farbstoff in Einzellaser-Systemen nicht gemeinsam mit anderen bei >600 nm emittierenden Fluorochromen wie PerCP oder RPE-Cy5 verwendet werden.
14. Eine Agglomeration der Zählkontrollperlen ist beschrieben worden (4). CytoCount™ Perlen weisen eine besonders geringe Anzahl an Zusammenhaftungen (unter 3 %) auf, was das Gating der Perlen erleichtert. Falls eine höhere Anzahl an CytoCount™ Zusammenhaftungen beobachtet wird, die auf ein Problem mit dem Produkt hindeutet, bitte den technischen Kundendienst von DakoCytomation verständigen.

Aufbewahrung

Das Kit bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Kit aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien anders als unter den genannten Bedingungen aufbewahrt, sind diese Bedingungen vom Anwender zu validieren.

EasyLyse™, Fläschchen 2, ist nach dem Öffnen 6 Monate lang stabil. Nach Verdünnung ist das Lysierungsreagenz bei 2–24 °C 20 Tage lang stabil.

Alle Reagenzien aufrecht aufbewahren.

Probenentnahme und -vorbehandlung

Peripheres Blut unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktion in ein steriles K₃EDTA-Blutproberöhrchen entnehmen. Für jeden Test sind 200 µL der Probe erforderlich (100 µL pro Röhrchen). Die Richtlinien des Herstellers der Blutproberöhrchen für die Probenentnahme einhalten. Leukaphereseproben entsprechend den Anweisungen des Herstellers des Leukapheresegeräts entnehmen.

Bis zur Färbung das mit Gerinnungshemmern versehene Blut bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) aufbewahren.

Die Proben peripheren Bluts innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme färben. Es wird empfohlen, die Leukaphereseproben zur gleichen Zeit zu färben, zu der das Leukaphereseprodukt verarbeitet wird.

Für alle auszuwertenden Proben die Leukozytenzahl ermitteln. Falls die Anzahl der Leukozyten über 10^7 WBC/mL liegt, die Probe mit phosphatgepufferter Salzlösung auf 10^7 WBC/mL verdünnen.

Zur Berechnung der endgültigen absoluten Anzahl CD34-positiver Zellen in der Ursprungsprobe den Verdünnungsfaktor notieren.

Keine vorfixierten Zellen verwenden.

Färbeverfahren

Färben von Zellen und Zugabe von Zählkontrollperlen

1. Die Ursprungsprobe mit PBS auf etwa 10^7 Leukozyten pro mL verdünnen. Den exakten Verdünnungsfaktor notieren. In den meisten Fällen ist die Verdünnung nur bei den Leukaphereseproben erforderlich.
2. Jede Probe muss doppelt getestet werden. Aus diesem Grund für jede Probe zwei Teströhrchen kennzeichnen.
3. 100 µL der Probe in jedes Teströhrchen pipettieren. Mit Reverse-Pipetting arbeiten (siehe untenstehende Richtlinie zum Reverse-Pipetting-Verfahren „mit vorbefeuchteter Spitze“).
4. Jedem Teströhrchen 10 µL aus Fläschchen 1 (Anti-human-CD45/FITC und Anti-human-CD34/RPE) zugeben und auf einem Vortexer mischen. Die Röhrchen 30 Minuten bei 2–8 °C oder 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.
5. 2 mL verdünntes Lysierungsreagenz zugeben (Fläschchen 2, EasyLyse™, 20fach verdünnt). Die Probe unmittelbar nach Zusatz des Lysierungsreagenz auf einem Vortexer mischen.
6. 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Falls Bestimmung der Lebensfähigkeit gewünscht ist, jeder Probe 10 µL aus Fläschchen 3 (7-AAD) zugeben und mischen. Andernfalls mit Schritt 8 fortfahren. Vor dem Erfassen mindestens 5 Minuten mit 7-AAD inkubieren.
8. Wie unter „Vorbereitung der Reagenzien“ beschrieben, Fläschchen 4 (CytoCount™) auf einem Drehrührwerk resuspendieren. Der gefärbten und lysierten Probe 100 µL zugeben. Sowohl die Probe als auch die CytoCount™ Perlen mit derselben kalibrierten Pipette nach dem Reverse-Pipetting-Verfahren „mit vorbefeuchteter Spitze“ pipettieren (4) (siehe untenstehende Richtlinie zum Reverse-Pipetting-Verfahren „mit vorbefeuchteter Spitze“).
9. Vor der Erfassung die Perlen und die Probe 3 Sekunden vorsichtig auf einem Vortexer mischen, um die gleichmäßige Verteilung der CytoCount™ Perlen in der Probe zu gewährleisten.
10. Die Erfassung der Probe muss innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe des Lysierungsreagenz erfolgen (Schritt 5).
11. Mindestens 60.000 Leukozyten-Ereignisse, 1.000 CytoCount™ Perlen und mindestens 100 CD34-positive Zellen erfassen (4). Bitte die Erfassungseinstellungen für das CD34Count Kit beachten.

Richtlinie, Reverse-Pipetting-Verfahren „mit vorbefeuchteter Spitze“

Zum Dispensieren der Probe und der Perlen dieselbe Pipette verwenden. Für jedes Reagenz eine saubere Spitze benutzen. Die Anwendung desselben Verfahrens beim Dispensieren von Probe und Perlen gewährleistet besser übereinstimmende Ergebnisse.

Probe

1. Kolben bis zum zweiten Anschlag drücken, Spitze in die Flüssigkeit eintauchen und Probe aspirieren. Dann den Kolben bis zum ersten Anschlag drücken und die Probe dispensieren. Die Pipettenspitze müsste nun überschüssige Flüssigkeit enthalten.
2. Diesen Schritt zweimal wiederholen, dabei die Pipettenspitze in der Probe belassen.
3. Die Pipettenspitze ist nun gebrauchsfertig. Kolben bis zum **zweiten** Anschlag drücken, Spitze in die Flüssigkeit eintauchen und Probe aspirieren. Die Pipettenspitze vorsichtig aus der Probe nehmen und zum Entfernen überschüssiger Flüssigkeit behutsam mit Papiertuch

abwischen.

Die Öffnung der Spitze darf dabei nicht berührt werden, um nicht versehentlich die Probe aus der Pipettenspitze zu entfernen.

- Die Pipette soweit wie möglich senkrecht halten. Spitze auf Luftblasen überprüfen. Falls Luftblasen vorhanden sind, die Flüssigkeit wieder in die Probe dispensieren und die Probeentnahme wiederholen.
- Die Probe bis zum **ersten** Kolbenanschlag dispensieren, nach dem Dispensieren der Flüssigkeit sollte noch Restflüssigkeit in der Pipettenspitze sichtbar sein. Die Innenwände des Teströhrchens beim Herausziehen der Spitze nicht berühren.

Perlen

- Die Pipette mit der CytoCount™ Perlensuspension in Fläschchen 4 wie oben beschrieben vorbereiten (Schritte 1 bis 3).
- Zum Dispensieren der Perlensuspension die Pipette in der Nähe der Oberfläche der Probe auf die Innenwand des Röhrchens aufsetzen; leichtes Schräghalten von Röhrchen und Pipette erleichtert diesen Schritt. Flüssigkeit bis zum **ersten** Kolbenanschlag dispensieren, nach dem Dispensieren der Flüssigkeit sollte Restflüssigkeit in der Pipettenspitze sichtbar sein.
- Um weitere Perlen zu dispensieren, Spitze in das Fläschchen mit CytoCount™ eintauchen und weitere Perlensuspension aspirieren, ohne die nach dem ersten Pipettieren in der Spitze verbliebene Restflüssigkeit zu dispensieren.
- Falls die Spitze nicht mit der Probe in Kontakt gewesen ist, sollte die Restflüssigkeit in der Spitze wieder in das CytoCount™ Fläschchen dispensiert werden. Wird die Restflüssigkeit verworfen, so reicht das Reagenz möglicherweise nicht für 50 Doppel-Tests aus.

Qualitätskontrolle

Kontrollprobe

Es wird empfohlen, im Hinblick auf die korrekte Einstellung für das Auszählen CD34-positiver Zellen eine positive Kontrollprobe als Qualitätskontrolle mitzuführen. Als positive Kontrollprobe wird DakoCytomation CD-Chex® CD34, Code Nr. K2358 oder K2422 empfohlen. Bei Verwendung von CD-Chex® CD34 sollte der Probe kein 7-AAD beigegeben werden, da alle Kontrollzellen fixiert wurden und daher von 7-AAD gefärbt werden.

Die Teilnahme an einem externen Bewertungsprogramm wird dringend empfohlen.

Zeitdauer als Qualitätskontrolle

Als interne Qualitätskontrollprüfung kann bei Single-Platform-Bestimmungen die Zeitdauer dienen, da Studien ergeben haben, dass bei den meisten Durchflusszytometern die Anzahl der in einem bestimmten Zeitabschnitt erfassten Perlen auffällig konstant ist. Der Anwender kann für einen vorgegebenen Zeitraum für jede neue Charge von Perlen eine mittlere Perlenzahl im Bereich von ± 2 SA ableiten. Jede Probe, deren Perlenzahl außerhalb dieses Bereichs liegt, weist auf einen möglichen Pipettierfehler hin und sollte erneut gefärbt werden (6).

Doppel-Tests Jede Probe muss doppelt getestet werden. Die Differenz zwischen den bei den Doppel-Tests ermittelten Ergebnissen sollte maximal 15 % betragen. Andernfalls ist die Probe erneut zu testen. Die Differenz zwischen den beiden Werten (X und Y) wird wie folgt berechnet:

$$\frac{|X-Y|}{(X+Y)/2} \times 100 \%$$

Datenerfassung

Das Zytometer entsprechend den Herstellerempfehlungen auf trichromatische Erfassung einstellen. Bei der Einstellung sind sowohl die Einstellung bzw. Überprüfung der Spannungswerte des Fotomultipliers und der Geräteempfindlichkeit als auch Abgleich zu berücksichtigen, falls ein Hardwareabgleich erfolgt.

Die Erfassungseinstellungen für die Durchflusszytometer FACSCalibur (Beckton Dickinson) bzw. Coulter XL (Beckman Coulter) sind von Sutherland et al. (1) bzw. Gratama et al. beschrieben worden. (2).

Erfassungseinstellung für das CD34Count Kit

Die Daten können während der Erfassung entweder mit **oder** ohne Hardwareabgleich aufgezeichnet werden. Im letzteren Fall wird der Abgleich während der Datenanalyse vorgenommen. Hinsichtlich der Einstellung des Abgleichs bitte die allgemeinen Richtlinien zur Durchflusszytometrie beachten.

Das folgende Protokoll wurde sowohl für Erfassung als auch Analyse entwickelt.

1. Folgende zweidimensionale Datenanzeigen (Dot-Plots) erstellen und Bereiche gemäß den Zahlen festlegen:

Plot A: CD45 FITC verglichen mit SSC-H (Bereich 1 und Bereich 5)

Plot B: CD34 RPE verglichen mit SSC-H (Bereich 2)

Plot C: CD45 FITC verglichen mit SSC-H (Bereich 3)

Plot D: FSC-H verglichen mit SSC-H (Bereich 4)

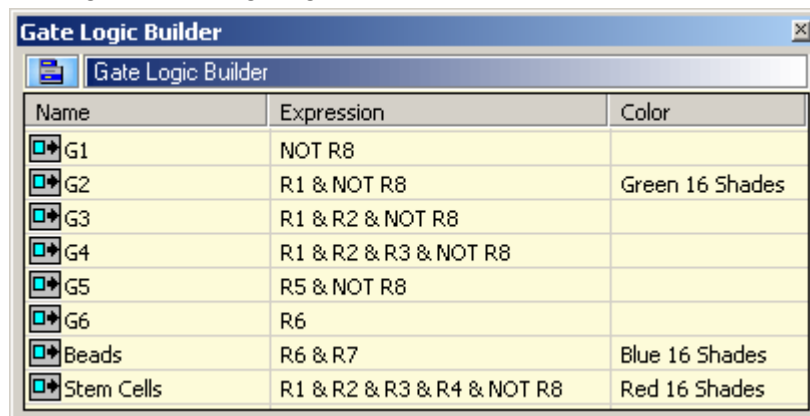
Plot E: 7-AAD verglichen mit SSC-H (Bereich 8)

Plot F: CD45 FITC verglichen mit CD34 RPE (Bereich 6 und Bereich 9)

Plot G: Zeitdauer verglichen mit FSC-H nach Gating auf CytoCount™ Ereignisse (Bereich 7)

Plot H: FSC-H verglichen mit SSC-H

2. Folgende Gating-Logik erstellen (Farben optional):



Name	Expression	Color
G1	NOT R8	
G2	R1 & NOT R8	Green 16 Shades
G3	R1 & R2 & NOT R8	
G4	R1 & R2 & R3 & NOT R8	
G5	R5 & NOT R8	
G6	R6	
Beads	R6 & R7	Blue 16 Shades
Stem Cells	R1 & R2 & R3 & R4 & NOT R8	Red 16 Shades

G7 wird als „Stammzellen“ bezeichnet und zum Färben CD34-positiver Ereignisse der Erstellungsfunktion für das Logik-Gate hinzugefügt. Das Farb-Gating ist während der Erfassung und Analyse sehr nützlich.

3. Die Gates wie folgt auf die Plots anwenden

Plot A: G1

Plot B: G2

Plot C: G3

Plot D: G4

Plot E: Ohne Gate

Plot F: Ohne Gate

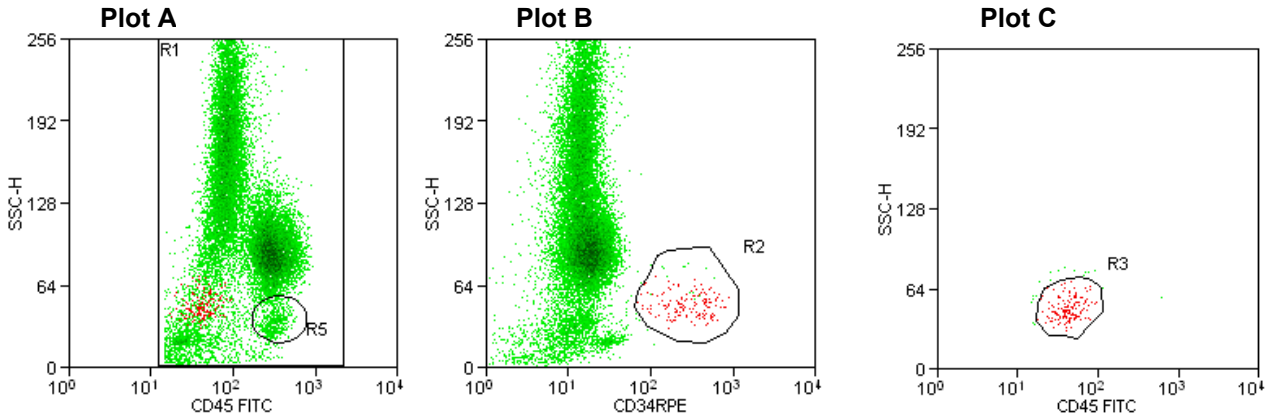
Plot G: G6

Plot H: Ohne Gate

4. Den Schwellenwert auf FL-1 so definieren, dass alle CD45-negativen Ereignisse gesperrt sind. Die Definition des Schwellenwerts bei FL-1 wird empfohlen, da so das Risiko des Ausschlusses von CytoCount™ Perlen minimiert wird. Für die FSC-Parameter kann ein Schwellenwert definiert werden, allerdings dürfen dabei keine Perlen-Ereignisse ausgeschlossen werden. Bitte den Abschnitt „Fehlersuche und -behebung“ beachten.

5. Erste Probe laden und Verstärker des Fotomultipliers auf FSC und SSC unter Berücksichtigung von Plot H so justieren, dass alle Populationen innerhalb des Maßstabs liegen. Falls ein Schwellenwert für die FSC-Parameter definiert wird, müssen die CytoCount™ Ereignisse oberhalb dieses Schwellenwerts liegen.

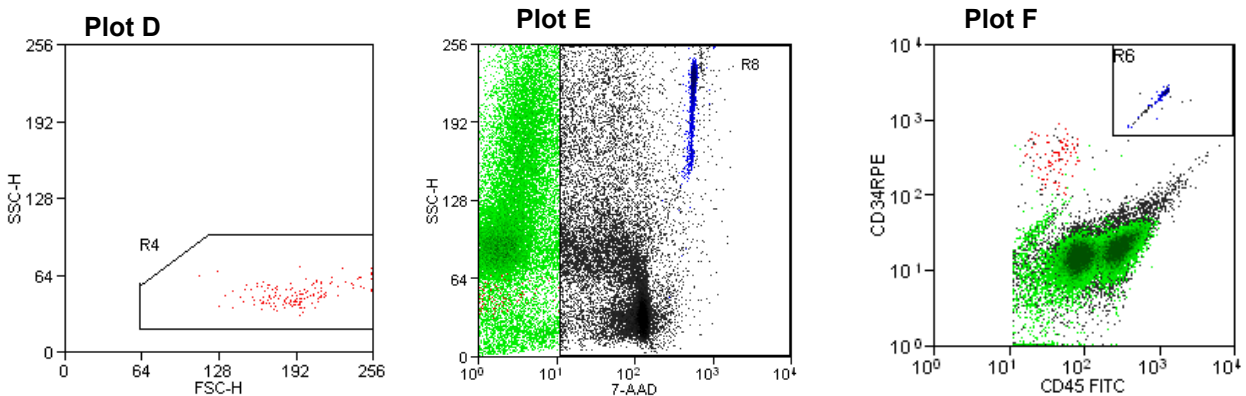
6. Den Fotomultiplier auf CD45/FITC anpassen. Die Lymphozytenpopulation sollte in die dritte Dekade fallen (Plot A). Es dürfen keine schwach CD45-positiven Zellen ausgeschlossen werden. Im Zweifel entweder den FL1-Schwellenwert absenken oder die Verstärkung des Fotomultipliers für FL1 erhöhen. Bei einer Veränderung der PMT-Einstellungen müssen ggf. auch die Abgleichereinstellungen angepasst werden.



7. Den Fotomultiplier auf CD34/RPE anpassen. Die Mehrzahl der negativen Ereignisse sollte zwischen die erste und zweite Dekade fallen (Plot B).

8. Den Fotomultiplier auf 7-AAD anpassen. Die Mehrzahl der negativen Ereignisse sollte in die erste Dekade fallen (Plot E).

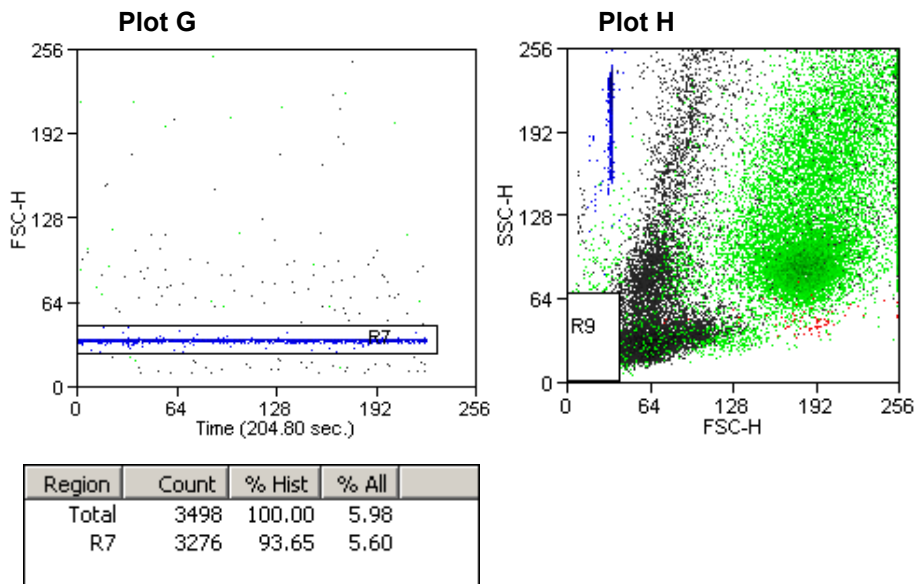
9. Bereich 6 aus Plot F auf Plot G anwenden. Falls ein Schwellenwert für den FSC-Parameter festgelegt wurde, Plot G als Kontrolle dafür verwenden, dass durch die Schwellenwert-Definition keine CytoCount™ Ereignisse verloren gegangen sind (siehe „Fehlersuche und -behebung“).



Region	Count	% ...	% All
Total	216	100.00	0.37
R4	216	100.00	0.37

10. Es wird empfohlen, in Plot H ein Ausschluss-Gate zu verwenden. Dieses sollte die Ereignisse mit niedrigen SSC- und FSC-Werten einschließen (Bereich 9). Während der Erfassung sollten Ereignisse, die in dieses Gate fallen, zurückgewiesen werden. Dieses wird durch einen Gate-Filter (Ausschluss-Gate) für diese Ereignisse bzw. durch Zurückweisen der Ereignisse im Erfassungsfenster in R9 erreicht. Wird der FSC-Parameter als Schwellenwert zugrunde gelegt, so ist dieser Gate-Filter nicht relevant.

11. Während der Erfassung muss die Zeitdauer als Parameter festgehalten werden.



Das Gerät ist nun für die Erfassung bereit.

12. Mindestens 60.000 Leukozytenereignisse, 1.000 CytoCount™ Ereignisse und 100 CD34-positive Ereignisse erfassen. Nur für eine dieser Zahlen kann ein Abbruchkriterium definiert werden. Für Proben mit niedrigen CD34+ Werten sind die 100 CD34-positiven Ereignisse das Abbruchkriterium, während die 60.000 Leukozytenereignisse das Abbruchkriterium für Proben mit hohen CD34+ Werten sind. Es wird empfohlen, so viele Ereignisse wie möglich zu erfassen, da hierdurch die Anzahl CD34-positiver Zellen am genauesten ermittelt wird.

Datenanalyse

Für die Analyse dasselbe Protokoll wie für die Erfassung verwenden.

1. Die Abgleicheinstellung gemäß den Softwareanleitungen für Daten vornehmen, die ohne Hardwareabgleich erfasst wurden. Dabei ist der Abgleich für Überschneidungen des RPE-Kanals mit dem 7-AAD-Kanal entscheidend (siehe Vorsichtsmaßnahmen).
2. Statistiken werden für Bereich 4 (Stammzellen), der CD34-positive Vorläuferzellen ausweist, und für Bereich 7 (Perlen) erstellt, der die Anzahl der Perlen angibt. Eine Statistik sollte auch für Bereich 1 (G2) angezeigt werden, falls die Anzahl der erfassten lebenden CD45-positiven Zellen benötigt wird.
3. Die Datei der erfassten Daten importieren (FSC-Datei) und die Bereiche einstellen.
4. In Plot D G5 anwenden und Bereich 4 so einstellen, dass nur die kleinsten Lymphozyten berücksichtigt werden (Abbildung 1(a)).
5. Nun G4 in Plot D anwenden und Bereich 4 in derselben Position halten (Abbildung 1(b)).

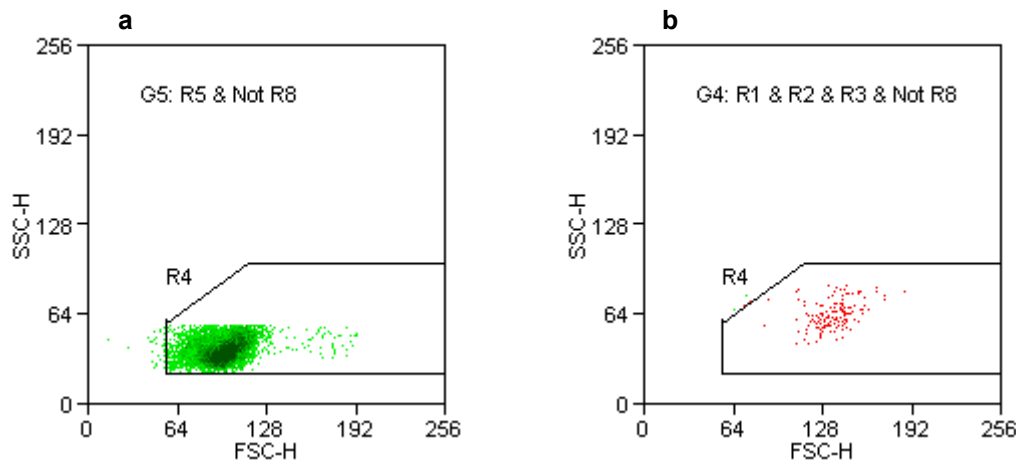


Abbildung 1. (a): Bereich 4 wird so eingestellt, dass sowohl Ereignisse, die größer als die kleinsten Lymphozyten sind, als auch Ereignisse mit niedriger seitlicher Streuung berücksichtigt werden.

(b): nach dem Einstellen von Bereich 4 für lebende Lymphozyten wird der Plot auf G4 gesteuert, um diejenigen Ereignisse anzuzeigen, die die in der ISHAGE-Gating-Strategie definierten Anforderungen erfüllen.

Ergebnisse

Berechnung der absoluten Anzahl CD34-positiver Zellen pro μL der Ursprungsprobe:

Zur Berechnung der absoluten Anzahl CD34-positiver Zellen folgende Gleichung verwenden:

CD34+ Zellen/ μL =

$$\frac{\text{Gezählte Anzahl CD34-positiver Zellen (R4)} \times \text{CytoCount™ Konzentration}}{\text{Gezählte Perlenanzahl (R7)}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

*Dieser Wert (C) befindet sich auf dem Etikett von Fläschchen 4: C= Perlenanzahl/ μL

Für das dargestellte Beispiel (Plots A bis H) gilt folgende Berechnung der absoluten Anzahl CD34-positiver Zellen:

$$\frac{216 \times 1006}{3276} \times 1 = 66 \text{ CD34+ Zellen}/\mu\text{L}$$

Das Endergebnis ist der Durchschnittswert der Doppel-Tests. DakoCytomation empfiehlt, dass die Differenz zwischen diesen beiden Werten nicht größer sein sollte als 15 %, andernfalls sollte die Probe erneut analysiert werden (siehe „Qualitätskontrolle“).

Wertzuordnung

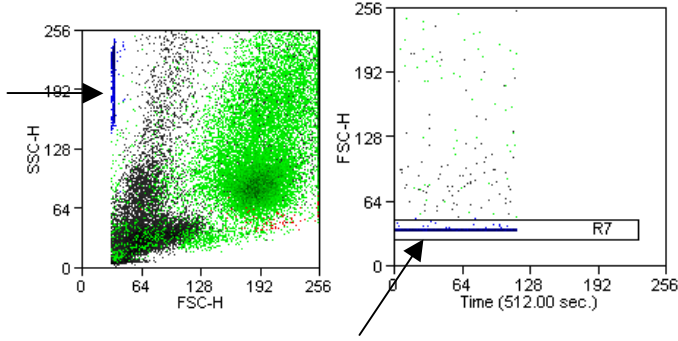
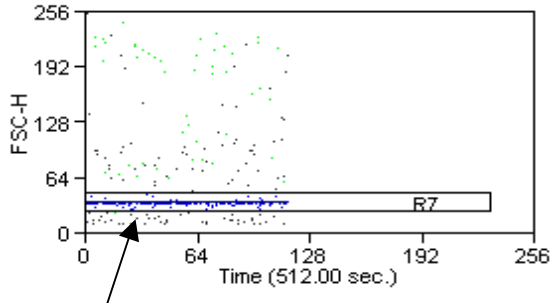
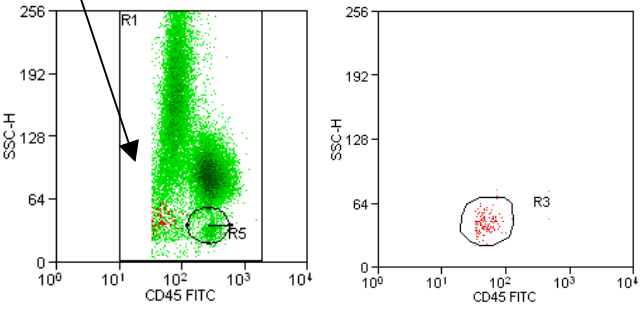
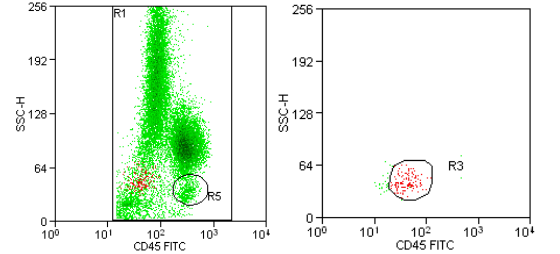
Die Perlenkonzentration (C) und die zugehörige Standardabweichung (S) sind auf dem Etikett von Fläschchen 4 als Anzahl/ μL angegeben. Diese Zahl wurde mit einem Coulter Z1 Partikelzähler ermittelt. Die Standardabweichung der Perlenkonzentration trägt geringfügig zur Gesamt-Ungewissheit des analytischen Ergebnisses bei.

Beschränkungen

1. Aufgrund der Unterschiede bei biologischen Proben werden manche Proben möglicherweise nicht korrekt analysiert. Ein in der Durchflusszytometrie erfahrener Experte muss alle Dot-Plots kritisch überprüfen. Ein unrichtig hohes Ergebnis könnte ein Infusat mit einer niedrigeren als der empfohlenen Schwellendosis CD34-positiver Zellen zur Folge haben.
2. Ergebnisse des CD34Count Kits müssen im Zusammenhang mit weiteren, auf klinischem Wege bzw. mit weiteren diagnostischen Verfahren gewonnenen Daten interpretiert werden.

3. Blutproben bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufbewahren.
4. Keine bereits fixierten und gelagerten Patientenproben verwenden.
5. Die Anzahl der Leukozyten in der Probe sollte nicht mehr als 10^7 /mL und die Anzahl der CD34-positiven Zellen nicht mehr als 2.000/ μ L betragen.

Fehlersuche und -behebung

Problem	Lösung
<p>Einige Perlenereignisse gehen verloren, da für die FSC-H-Parameter ein zu hoher Schwellenwert definiert wurde.</p>  <p>Falsch: Bei den FSC-H-Parametern werden keine Ereignisse beobachtet, die unterhalb der Haupt-Perlenpopulation liegen. Einige CytoCount™ Perlen wurden nicht erfasst.</p>	<p>Erneuter Durchlauf für die Probe mit einem niedrigen FSC-H-Schwellenwert. Es wird allerdings empfohlen, den FL1-Parameter als Schwellenwert festzulegen.</p>  <p>Richtig: Ereignisse, die kleiner als die Haupt-Perlenpopulation sind, werden dargestellt. Vollständige Erfassung der CytoCount™ Perlen.</p>
<p>Ein Teil der CD34-positiven Population wird nicht erfasst, da für FL1 ein zu hoher Schwellenwert definiert wurde.</p> 	<p>Erneuter Durchlauf für die Probe mit einem niedrigen Schwellenwert für FL1.</p> 
<p>Qualitätskontrollprobe außerhalb des Bereichs.</p>	<p>Durchflusszytometer- und Erfassungseinstellungen überprüfen und erneuter Durchlauf mit der Qualitätskontrollprobe. Falls das Ergebnis immer noch außerhalb des Bereichs liegt, Ihren Gerätekundendienst verständigen.</p>
<p>Schwierigkeiten bei der Einstellung der Bereiche.</p>	<p>Die Dot-Plots vergrößern und die Bereiche erneut einstellen.</p>

Gerät

CD34Count Kit ist für die Verwendung mit einem Durchflusszytometer bestimmt. Dieses muss mit der geeigneten Computerhardware und -software und einem Laser von 488 nm ausgerüstet sein. Das Durchflusszytometer muss Fluoreszenzen folgender Wellenlängen nachweisen können:










515–545 nm (FL1), 562–607 nm (FL2) und >650 nm (FL3 oder FL4, je nach Gerät). Darüber hinaus muss es Lichtstreuung (nach vorne gerichtete und seitliche Streuung) nachweisen können. Für das Gerät muss sich ein Schwellenwert entweder für FL1 oder die Parameter für die nach vorne gerichtete Streuung festsetzen lassen.

Bitte die vom Hersteller des Geräts empfohlenen Qualitätskontrolleinstellungen beachten. Diese Einstellungen sollten die Festlegung bzw. Überprüfung der Spannungswerte des Fotomultipliers, den Fluoreszenzabgleich und die Geräteempfindlichkeit berücksichtigen.

References/ Références/ Literatur

1. Sutherland DR, Keeney M, Gratama JW. Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. Current Protocols in Cytometry. New York: John Wiley & Sons; 2003. p. 6.4.1-23.
2. Gratama JW, Keeney M, Sutherland DR. Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. Current protocols in cytometry. New York: John Wiley & Sons; 1999. p. 6.4.1-22.
3. Keeney M, Gratama JW, Sutherland DR. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. Cytometry 2004;58A:72-5.
4. Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, et al. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood (review). Cytometry 2000;42:327-46.
5. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. J Hematother 1996;5:213-26.
6. Bergeron M, Lustyik G, Phaneuf S, Ding T, Nicholson JKA, Janossy G, et al. Stability of currently used cytometers facilitates the identification of pipetting errors and their volumetric operation: "time" can tell all. Cytometry 2003;52B:37-40.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Batch code Code du lot Chargenbezeichnung
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'abri de la lumière (voir la section Conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)	 Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Contains sufficient for <n> tests Quantité suffisante pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	 Manufacturer Fabricant Hersteller

Produced by/ Produit par/ Hersteller:

DakoCytomation Denmark A/S

Produktionsvej 42

DK-2600 Glostrup

Denmark/ Danemark/ Dänemark

Tel.+45 44 85 95 00

Fax+45 44 85 95 95

www.dakocytomation.com