

Monoclonal Mouse Anti-Human CD61, Platelet Glycoprotein IIIa/APC, Clone Y2/51 Code/ Réf./ Code-Nr. C7280
Monoclonal Mouse Anti-Human CD61, Platelet Glycoprotein IIIa/FITC, Clone Y2/51 Code/ Réf./ Code-Nr. F0803

ENGLISH

Intended use For in vitro diagnostic use.
 C7280 and F0803 are intended for use in flow cytometry. CD61 is a selective marker of platelets and platelet precursors, and antibodies to CD61 may be of value for identification of megakaryoblastic leukaemias (1, 2). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

Synonym for antigen 9-o-acetyl-GD3 (1).

Introduction CD61 is a 110 kDa single-chain protein and is the common β -subunit of the CD41/CD61 and the CD51/CD61 complexes, both of which are noncovalently associated heterodimers. The complexes require divalent cations for complex integrity and receptor functions (1). The CD41/CD61 complex appears early in megakaryocyte maturation (3). The activated CD41/CD61 complex is a receptor for von Willebrand factor, soluble fibrinogen and fibronectin (1) and plays a central role in platelet activation and aggregation (4). Glanzmann's thrombasthenia is a well-defined but rare inherited disorder of platelet function. It is caused by deficiency or abnormality of the CD41/CD61 complex with bleeding due to defective platelet hemostatic plug formation. Glanzmann's thrombasthenia has been classified into two types: type 1, in which CD41/CD61 is nearly completely absent; and type 2 in which 5-20% of the complex is expressed (5). Clot retraction is absent in type 1 and normal or moderately decreased in type 2. CD51/CD61 complexes play a role in tumour metastasis and adenoviral infection (1).

Reagent provided The Anti-CD61 conjugates, C7280 and F0803, have been produced from a purified monoclonal mouse antibody. The conjugates are provided in liquid form in buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2. Each vial contains 100 tests (10 μ L of conjugate for up to 10⁶ platelets from normal human peripheral blood).
Isotype: IgG1, kappa. Conjugate concentration mg/L: See label on vial.

Antibody Code	Fluorochrome	Control ReagentCode
C7280	APC (Allophycocyanin)	X0968
F0803	FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1)	X0927

Immunogen Phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood cells (6).

Specificity Anti-CD61, Y2/51, was included in the Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens and studies by a number of laboratories confirmed its reactivity with CD61 (7).
 Anti-CD61 detects platelets in peripheral blood and bone marrow and it also reacts with megakaryocytes (6).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN₃), 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.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

Storage Store in the dark at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

Staining procedure

1. Collect venous blood into a test tube containing EDTA as an anticoagulant.
2. Within 5 minutes centrifuge at 200 x g for 5 minutes at room temperature.
3. Collect 100 μ L of the upper platelet-rich plasma (this is sufficient for 20 tests) and mix into 1 mL of 1% paraformaldehyde in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4. Incubate at 4 °C for ½-1 hour.
4. Centrifuge at 1200 x g for 5 minutes at room temperature. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 μ L of fluid.
5. Add 2 mL 0.01 mol/L PBS, pH 7.4, and resuspend the platelets by using a vortex mixer.
6. Centrifuge at 1200 x g for 5 minutes at room temperature. Gently aspirate the supernatant and discard it leaving approximately 50 μ L of fluid.
7. Add 1 mL 0.01 mol/L PBS containing 2% fetal calf serum and resuspend the platelets by using a vortex mixer.
8. Mix 50 μ L platelet suspension with 10 μ L fluorochrome-conjugated Anti-CD61.
9. Incubate in the dark at 4 °C for 20 minutes.
10. Wash with PBS. Resuspend the platelets in an appropriate fluid for flow cytometry, e.g. 0.3 mL 1% paraformaldehyde (fixative) in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4.
11. Analyse on a flow cytometer.

Note that fluorochrome conjugates are light sensitive, and samples should be protected from light during the staining procedure and until the analysis.

Procedural notes

Step 1: It is optional to include a suitable positive and negative control sample with each run for reagent and preparation control.

Step 8: The volume of conjugate recommended is a guideline only. Optimal staining conditions may vary depending on specimen and preparation method and should be determined by each individual laboratory.

It is optional to include a control reagent test tube. The control reagent should match the isotype and fluorochrome of the conjugated antibody. Recommended control reagents are shown in the table above.

Product-specific limitation C7280 and F0803 will in conjunction with Dako lysing procedures form platelet-leukocyte aggregates (PLA). PLA can be reduced by employing a no-lyse-no-wash procedure (8).

FRANÇAIS

Utilisation prévue Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.
Le C7280 et le F0803 sont destinés à être utilisés en cytométrie de flux. Le CD61 est un marqueur sélectif des plaquettes et de leurs précurseurs, et les anticorps dirigés contre le CD61 peuvent être précieux dans le cadre de l'identification des leucémies mégacaryoblastiques (1, 2). Les résultats doivent être interprétés par un professionnel qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques.

Synonyme de l'antigène 9-o-acétyl-GD3 (1).

Introduction Le CD61 est une protéine monocaténaire de 110 KDa et constitue la sous-unité β commune aux complexes CD41/CD61 et CD51/CD61, qui sont tous deux des hétérodimères liés de façon non covalente. Les complexes nécessitent des cations divalents pour l'intégrité des complexes et les fonctions réceptrices (1).

Le complexe CD41/CD61 apparaît à un stade précoce de la maturation des mégacaryocytes (3). Le complexe CD41/CD61 activé est un récepteur du facteur de von Willebrand, du fibrinogène soluble et de la fibronectine (1) et joue un rôle essentiel dans l'activation et l'agrégation des plaquettes (4).

La thrombasthénie de Glanzmann est un trouble héréditaire bien défini mais rare de la fonction plaquettaire. Elle est causée par une déficience ou une anomalie du complexe CD41/CD61 avec une hémorragie due à une défaillance lors de la formation du bouchon hémostatique plaquettaire. La thrombasthénie de Glanzmann a été divisée en deux types : le type 1, dans lequel le complexe CD41/CD61 est presque complètement absent, et le type 2, dans lequel 5 à 20 % du complexe est exprimé (5). La rétraction du caillot est absente dans le type 1 et normale ou légèrement réduite dans le type 2.

Les complexes CD51/CD61 jouent un rôle dans le processus de métastase des tumeurs et dans l'infection adénovirale (1).

Réactifs fournis Les conjugués anti-CD61, le C7280 et le F0803, ont été préparés à partir d'un anticorps monoclonal de souris purifié. Les conjugués sont fournis sous forme liquide dans un tampon contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) et 15 mmol/L d'azide de sodium (NaN_3), d'un pH de 7,2. Chaque flacon contient suffisamment de conjugué pour 100 tests (10 μL de conjugué pour 10^6 leucocytes au maximum issus du sang périphérique d'individus sains).

Isotype : IgG1, kappa. Concentration des conjugués en mg/L : voir l'étiquette du flacon.

Réf. de l'anticorps	Fluorochrome	Réf. du réactif de contrôle
C7280	Allophycocyanine (APC)	X0968
F0803	FITC (Isomère 1 de l'isothiocyanate de fluorescéine)	X0927

Immunogène Cellules du sang périphérique stimulées par de la phytohémagglutinine (PHA) (6).

Spécificité L'anticorps Anti-CD61, Y2/51 a été évoqué lors de la Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Quatrième conférence et atelier internationaux sur les antigènes de différenciation des leucocytes humains [HLDA]). Les études réalisées par plusieurs laboratoires ont confirmé sa réactivité avec le CD61 (7).

L'anticorps Anti-CD61 détecte les plaquettes dans le sang périphérique et la moelle osseuse et réagit également avec les mégacaryocytes (6).

Précautions

1. Réservé aux professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique sous 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 et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

Conservation Conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons du patient. En cas de coloration inattendue, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et de suspicion d'un problème avec l'anticorps, contacter notre service technique.

Procédure de coloration

1. Prélever du sang veineux dans un tube à essai contenant de l'EDTA comme anticoagulant.
2. Dans un délai de 5 minutes, centrifuger à 200 g pendant 5 minutes et à température ambiante.
3. Prélever 100 μL de la phase supérieure du plasma riche en plaquettes (cette quantité est suffisante pour 20 tests), puis mélanger avec 1 mL de paraformaldéhyde à 1 % dans 0,01 mol/L de PBS de pH 7,4. Incuber à 4 °C pendant 30 à 60 minutes.
4. Centrifuger à 1 200 g pendant 5 minutes à température ambiante. Aspirer doucement le surnageant et l'éliminer en laissant environ 50 μL de liquide.
5. Ajouter 2 mL de PBS à 0,01 mol/L de pH 7,4 et remettre les plaquettes en suspension à l'aide d'un agitateur vortex.
6. Centrifuger à 1200 g pendant 5 minutes à température ambiante. Aspirer doucement le surnageant et l'éliminer en laissant environ 50 μL de liquide.
7. Ajouter 1 mL de PBS à 0,01 mol/L et contenant 2 % de sérum de veau fœtal, puis remettre les plaquettes en suspension à l'aide d'un agitateur vortex.
8. Mélanger 50 μL de la suspension plaquettaire avec 10 μL d'anticorps anti-CD61 conjugué à un fluorochrome.
9. Incuber dans l'obscurité à 4 °C pendant 20 minutes.
10. Laver avec du PBS. Remettre les plaquettes en suspension dans un liquide adapté à la cytométrie en flux, par exemple 0,3 mL de paraformaldéhyde à 1 % (fixateur) dans du PBS à 0,01 mol/L de pH 7,4.
11. Analyser à l'aide d'un cytomètre en flux.

Noter que les conjugués fluorochromes sont photosensibles. Les échantillons doivent donc être protégés de la lumière pendant la procédure de coloration et jusqu'à l'analyse.

Remarques sur la procédure Étape 1 : Il est facultatif d'inclure un échantillon de contrôle positif et négatif approprié à chaque cycle pour contrôler les réactifs et la préparation. Étape 8 : Le volume de conjugué n'est donné qu'à titre indicatif. Les conditions de coloration optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et de la méthode de préparation, et doivent être déterminées au cas par cas par chaque laboratoire.

L'utilisation d'un tube à essai de réactif de contrôle est facultative. Le réactif de contrôle doit correspondre à l'isotype et au fluorochrome de l'anticorps conjugué. Les réactifs de contrôle recommandés sont indiqués dans le tableau ci-dessus.

Limites spécifiques au produit Le C7280 et le F0803, en association avec les procédures de lyse de Dako, formeront des agrégats de leucocytes et de plaquettes. Ces agrégats peuvent être limités en utilisant une procédure sans lavage ni lyse (8).

DEUTSCH

Verwendungszweck Zur In-vitro-Diagnostik.
C7280 und F0803 sind für durchflusszytometrische Verfahren bestimmt. CD61 ist ein selektiver Marker für Thrombozyten und Thrombozytenvorläuferzellen; Antikörper gegen CD61 können den Nachweis der Megakaryoblastenleukämie unterstützen (1, 2). Auswertungen müssen von einem qualifizierten Experten unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Synonym für das Antigen 9-O-Acetyl-GD3 (1).

Einführung Bei CD61 handelt es sich um ein einkettiges Protein von 110 kDa, das als β -Subunit bei den CD41/CD61- und CD51/CD61-Komplexen vorkommt, beides nichtkovalent verknüpfte Heterodimere. Die Komplexe benötigen divalente Kationen für komplexe Integrations- und Rezeptorfunktionen (1).

Der CD41/CD61-Komplex erscheint im Frühstadium der Megakaryozytenreifung (3). Einerseits ist der aktivierte CD41/CD61-Komplex ein Rezeptor für den von Willebrand Faktor sowie für lösliches Fibrinogen und Fibronektin (1), andererseits spielt er eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und -aggregation (4).

Das Glanzmann-Naegeli-Syndrom ist eine klar definierte, aber seltene genetische Störung der Thrombozytenfunktion. Es wird durch einen Mangel bzw. eine Anomalie des CD41/CD61-Komplexes verursacht und ist durch Blutungen aufgrund einer Störung der hämostatischen Pfropfbildung durch fehlerhafte Thrombozyten charakterisiert. Beim Glanzmann-Naegeli-Syndrom wird zwischen zwei Typen unterschieden: Typ 1, bei dem CD41/CD61 nahezu vollständig fehlt, und Typ 2, bei dem 5–20% des Komplexes exprimiert wird (5). Die Gerinnselretraktion fehlt bei Typ 1 und ist bei Typ 2 normal oder leicht vermindert.

CD51/CD61-Komplexe spielen eine Rolle bei der Tumormetastasierung und bei Adenoviren-Infektionen (1).

Mitgelieferte Reagenzien Die Anti-CD61-Konjugate C7280 und F0803 wurden aus einem gereinigten monoklonalen Mausantikörper hergestellt. Sie werden in flüssiger Form in einem Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin (BSA) und 15 mmol/L Na₂S₂O₃, pH 7,2 geliefert. Das Konjugat in jedem Fläschchen ist ausreichend für 100 Tests (10 μ L Konjugat für bis zu 10⁶ Thrombozyten aus normalem, humanem, peripherem Blut).

Isotyp: IgG1, Kappa. Konjugatkonzentration mg/L: Siehe Fläschchenetikett.

Code-Nr. Antikörper	Fluorochrom	Code-Nr. Kontrollreagenz
C7280	APC (Allophycocyanin)	X0968
F0803	FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat-Isomer 1)	X0927

Immunogen Phytohämagglutininstimulierte periphere Blutzellen (6).

Spezifität Anti-CD61, Y2/51 wurde bei dem/der Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (4. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) untersucht, und seine Reaktivität mit CD61 wurde in Studien einer Reihe von Labors bestätigt (7).

Anti-CD61 weist Thrombozyten in peripherem Blut und Knochenmark nach und reagiert mit Megakaryozyten (6).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na₃N), 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.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

Aufbewahrung Im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Färbeverfahren

1. Venöses Blut entnehmen und in ein EDTA als Antikoagulans enthaltendes Teströhrchen füllen.
2. Innerhalb von 5 Minuten bei 200 x g für die Dauer von 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren.
3. 100 μ L des oberen, thrombozytenreichen Plasmas entnehmen (ausreichend für 20 Tests) und mit 1 mL 1% igem Paraformaldehyd in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4 mischen. Eine halbe bis eine Stunde lang bei 4 °C inkubieren.
4. 5 Minuten bei 1200 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 μ L Flüssigkeit übriglassen.
5. 2 mL 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, zugeben und die Thrombozyten mit einem Vortexer resuspendieren.
6. 5 Minuten bei 1200 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig absaugen und entsorgen, dabei etwa 50 μ L Flüssigkeit übriglassen.
7. 1 mL 0,01 mol/L PBS mit 2% fötalem Rinderserum zugeben und die Thrombozyten mit einem Vortexer resuspendieren.
8. 50 μ L der Thrombozyten-Suspension mit 10 μ L fluorochrom-konjugiertem Anti-CD61 mischen.
9. Im Dunkeln bei 4 °C 20 Minuten inkubieren.
10. Mit PBS spülen. Thrombozyten in einer geeigneten Flüssigkeit, z.B. 0,3 mL 1% iges Paraformaldehyd (Fixiermittel) in 0,01 mol/L PBS, pH 7,4, für die Durchflusszytometrie resuspendieren.
11. Auf einem Durchflusszytometer analysieren.

Bitte beachten, dass Fluorochrom-Konjugate lichtempfindlich sind und die Proben während des Färbeverfahrens und bis zur Analyse vor Licht geschützt werden müssen.

Hinweise Schritt 1: Als Kontrolle für das Reagenz und das Präparat kann bei jedem Durchlauf eine geeignete positive und negative Kontrollprobe mitlaufen.

Schritt 8: Die empfohlene Konjugatmenge gilt nur als Richtlinie. Optimale Färbungsbedingungen können je nach Probe und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst bestimmt werden.

Es kann auch ein Teströhrchen mit einem Kontrollreagenz mitgefärbt werden. Das Kontrollreagenz sollte den Isotypen und Fluorochromen des konjugierten Antikörpers entsprechen. Empfohlene Kontrollreagenzien sind in der Tabelle oben angegeben.










**Produktspezifische
Beschränkungen**
(8).

C7280 und F0803 bilden bei Lysierungsverfahren mit Dako-Produkten Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (platelet-leukocyte aggregates, PLA). Durch nicht lysierende Verfahren ohne Waschschrift kann die PLA-Bildung vermindert werden.

References/ Références/ Literatur

1. Sun Q-H, Newman PJ. CD Guide. CD61. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 810.
2. Van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editors. Leukemia. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company; 1996. p. 83-130.
3. Vinci G, Tabilio A, Deschamps JF, van Haeke D, Henri A, Guichard J, et al. Immunological study of *in vitro* maturation of human megakaryocytes. Br J Haematol 1984;56:589-605.
4. Nachman RL, Leung LLK. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. J Clin Invest 1982;69:263-9.
5. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. Blood 1990;75:1383-95.
6. Gatter KC, Cordell JL, Turley H, Heryet A, Kieffer N, Anstee DJ, et al. The immunohistological detection of platelets, megakaryocytes and thrombi in routinely processed specimens. Histopathology 1988;13:257-67.
7. von dem Borne AEG, Modderman PW, Admiraal LG, Nieuwenhuis HK. Joint report of the platelet section. P1: Platelet antibodies, the overall results. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p 951-66.
8. Hagberg IA, Lyberg T. Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. Platelets 2000;11:151-60.

Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
 IVD	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)		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 LOT	Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com

Revision / Révision / Revision 2020.11