

Monoklonální protilátka proti CD20, konjugovaná s FITC (CD20 FITC)

Kat. č. ED7005

1. Určený účel prostředku

Reagencie CD20 FITC je určena k identifikaci a počítání CD20 pozitivních lymfocytů v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie.

2. Princip testu

Tento test je založen na specifické vazbě monoklonální protilátky na antigen, který je exprimovaný na povrchu leukocytů. Monoklonální protilátka je konjugovaná s fluorescenční značkou. Během analýzy vzorku průtokovým cytometrem je detekována fluorescence jednotlivých buněk. Rozdíly v intenzitě fluorescence buněk umožňují separovat skupiny leukocytů na základě rozdílné exprese analyzovaného antigenu. Specifické barvení leukocytů probíhá v periferní krvi. Po inkubaci vzorku se značenou protilátkou jsou červené krvinky odstraněny pomocí lyze a leukocyty jsou analyzovány průtokovým cytometrem.

3. Poskytované materiály

Reagencie obsahuje myši monoklonální protilátku proti lidskému antigenu CD20 (klon LT20), která byla purifikována a označena fluorescein izothiokyanátem (FITC). Značená protilátka byla naředěna na optimální koncentraci do stabilizačního roztoku, který obsahuje PBS a 15mM azid sodný. Obsah vialky (2 ml reagencie) odpovídá provedení 100 testů.

Specifikace produktu

Obsah	100 testů, 2 ml
Použití	20 µl na test
Specifita	CD20
Klon	LT20
Izotyp	Myší IgG2a
Fluorochrom	FITC
λ excitace	488 nm
Emission maximum	525 nm

4. Nutné, ale neposkytované materiály

Vhodné zkumavky pro barvení buněk (např. 12 × 75 mm)
Komerční lyzační roztok
Fosfátový pufr (PBS)
Izotypová kontrola (myší IgG2a FITC)

5. Nutná zařízení

Automatické pipety s jednorázovými špičkami
Vortex
Centrifuga
Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm a správné filtry

6. Skladování a manipulace

Vialku s reagentií uchovávejte v temnu při teplotě 2-8 °C. Nezmrazujte. Nerozplhujte do alikvotů. Doba použitelnosti reagencie je vyznačena na etiketě vialky a na vnějším obalu.

7. Výstrahy, předběžná opatření a omezení

- Reagencie je určena pro In vitro diagnostiku v laboratořích mimo USA a Kanadu. Reagencie je ve shodě s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.
- Nepoužívejte reagenci po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialky před kontaminací.
- Reagenci nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Obsah vialky nesmí zmrznout.
- Nedodržení postupu měření může ovlivnit výsledky testu.
- Reagencie obsahuje azid sodný (NaN₃), který je v čistém stavu vysoce toxický, avšak koncentrace, která je v této reagenci (15mM), není již považována za nebezpečnou. Při likvidaci reagencie obsahující azid splachujte velkým množstvím vody.
- Krevní vzorky jsou považovány za potenciálně infekční materiál, a proto s nimi musí být náležitě nakládáno. Vyvarujte se kontaktu vzorků s pokožkou, očima a sliznicemi.
- V případě krevního vzorku s abnormálně vysokým počtem leukocytů je třeba vzorek naředit pomocí PBS na hodnotu kolem 5 × 10⁶ leukocytů na ml.
- Krevní vzorky od abnormálních pacientů

- mohou vykazovat abnormální hodnoty procent pozitivních buněk.
- Data mohou být špatně interpretována, pokud jsou fluorescenční signály špatně kompenzované, případně pokud jsou regiony buněk špatně umístěné.
 - Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není dobře seřízen a udržován.
 - Červené krvinky některých abnormálních pacientů mohou být rezistentní k lyzi pomocí lyzačních roztoků.
 - Krevní vzorky by neměly být skladovány déle než 24 hodin od odběru.

8. Vzorek

Použijte vzorek periferní krve odebraný do sterilní zkumavky s antikoagulantem (Heparin nebo EDTA).
Skladujte před obarvením za laboratorní teploty.

9. Postup

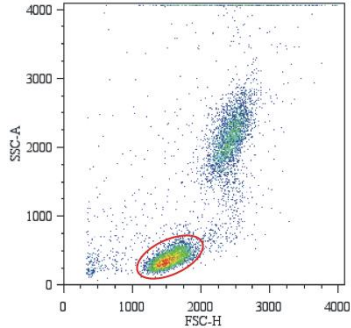
Postup barvení

- Pipetujte 20 µl reagencie CD20 FITC do zkumavky a stejné množství izotypové kontroly do kontrolní zkumavky.
- Přidejte 100 µl periferní krve do každé zkumavky a směs promíchejte pomocí vortexu.
- Inkubujte zkumavky 20-30 minut v temnu za laboratorní teploty.
- Provedte lyzi červenýchrvinek pomocí lyzačního roztoku. Je doporučeno používat komerční lyzační činidlo, které obsahuje formaldehyd fixující buňky. Postupujte podle návodu výrobce lyzačního činidla.
- Centrifugujte zkumavky 5 minut při 300 g.
- Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 3-4 ml PBS.
- Centrifugujte zkumavky 5 minut při 300 g.
- Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 0,3-0,5 ml PBS.
- Analizujte vzorky ihned po obarvení pomocí průtokového cytometru. V případě, že byly vzorky fixovány formaldehydem, je možné vzorky uskladnit v temnu při 2-8 °C a analyzovat do 24 hodin.

Analýza v průtokovém cytometru

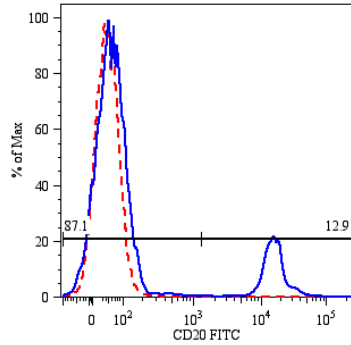
Vzorek obarvený pomocí reagencie CD20 FITC analyzujte průtokovým cytometrem. Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1.

Obr. 1: Ohraničení populace lymfocytů



Ohraničené lymfocyty vynešte do histogramu, kde osa x představuje intenzitu fluorescence FITC (viz Obr. 2). Oddělte pozitivní a negativní populace pomocí vhodných regionů a vypočítejte procento CD20 pozitivních lymfocytů. Region odpovídající negativním buňkám je doporučeno předem nastavit pomocí vhodné izotypové kontroly (myší IgG2a značená FITC). Izotypová kontrola pomůže odhadnout úroveň nespecifických vazeb značené protilátky na buňky.

Obr. 2: Lymfocyty obarvené pomocí reagencie CD20 FITC



10. Vlastnosti analytické funkce

Specifita

Monoklonální protilátka LT20 reaguje s antigenem CD20 (Bp35), neglykosylovaným membránovým fosfoproteinem o molekulové hmotnosti 33-37 kDa, který čtyřikrát prochází buněčnou membránou. Antigen CD20 je exprimován B lymfocyty, folikulárními dendritickými buňkami a v malé míře se nachází i na T lymfocytech v periferní krvi. Plasmatické buňky CD20 již neexprimují.

11. Vlastnosti klinické funkce

Očekávané hodnoty

Výsledky počtu pozitivních buněk mohou kolísat mezi jednotlivými laboratořemi. Každá laboratoř by si měla ustanovit vlastní rozsah normálních hodnot. V naší laboratoři byla reagencie CD20 FITC testována na 40 krevních vzorcích zdravých jedinců. Získané hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Parametr	Průměr (%)	SD	CV (%)
CD20+ lymfocyty	12,0	4,8	40,0

12. Odkazy

Glennie MJ et al. (2007) Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. Mol Immunol. 44: 3823-37

Teeling JL et al. (2006) The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. J Immunol. 177: 362-71

Cragg MS et al. (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. Curr Dir Autoimmun. 8: 140-174

Janas E et al. (2005) Functional role of lipid rafts in CD20 activity? Biochem Soc Symp. 72: 165-75

Li H et al. (2004) The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts. J Biol Chem. 279: 19893-19901

Chan HT et al. (2003) CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. Cancer Res. 63: 5480-9

Petrie RJ and Deans JP (2002) Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. J. Immunol. 169: 2886-2891

Polyak MJ et al. (2002) Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. Blood. 99: 3256-62

13. Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

14. Ochranné známky

N/A

15. Historie revizí

- Verze 1, ED7005_IFU_v1
První vydání.
- Verze 2, ED7005_IFU_v2
Sloučení tří jazykových mutací do jednoho dokumentu.
- Verze 3, ED7005_IFU_v3
Změna adresy: "Nad Safinou II 341".
- Verze 4, ED7005_IFU_v4
V sekci výstrahy, předběžná opatření a omezení bylo změněno - "Určeno pouze pro profesionální použití." - odstraněno. „Reagencie je určena pro In vitro diagnostiku v laboratořích mimo USA a Kanadu. Souprava je ve shodě s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.“ - přidáno.
- Verze 5, ED7005_IFU_v5
V sekci popis reagencie byl přidán text "stabilizační" a "roztok", byl odstraněn 0,2% (hmotn./obj.) hovězí sérový albumin (BSA) jako stabilizační činidlo."
- Verze 6, ED7005_IFU_v6
Změna loga výrobce. Změna grafického designu a celkového rozložení návodu k použití. Přidáno omezení pro skladování: "Chránit před slunečním zářením".
Změna PSČ výrobce z 25242 na 25250.



Monoklonální protilátka proti CD20, konjugovaná s FITC (CD20 FITC)

100 testů | Kat. č. ED7005



Návod k použití

Verze: ED7005_IFU_v6_CS

Datum vydání: 15-06-2020

CS

Symbole



Katalogové číslo



Kód dávky



Použit do data



Omezení teploty



Chránit před slunečním zářením



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



Označení shody CE



Čtěte návod k použití



Výrobce

Produkt je určen pro In Vitro diagnostické použití. In vivo diagnostické nebo terapeutické aplikace jsou zakázány.

Výrobky nesmějí být použity k dalšímu prodeji nebo převodu třetím osobám ani jako samostatný výrobek, ani jako součást výroby jiného výrobku bez písemného souhlasu EXBIO Praha, a.s.

EXBIO Praha, a.s. nenes odpovědnost za porušení patentu ani za žádné další porušení práv duševního vlastnictví, ke kterým může dojít při používání těchto produktů. Objednávky na všechny produkty jsou přijímány v souladu s pravidly a podmínkami dostupnými na www.exbio.cz. EXBIO, EXBIO Logo a všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti EXBIO Praha, a.s.