

Monoklonální protilátka proti CD4, konjugovaná s FITC (CD4 FITC)

Kat. č. ED7013

1. Určený účel prostředku

Reagencie CD4 FITC je určena k identifikaci a počítání CD4 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 CD4 (klon MEM-241), 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
Specifická	CD4
Klon	MEM-241
Izotyp	Myši IgG1
Fluorochrom	FITC
λ, excitace	488 nm
Emisní maximum	525 nm

4. Nutné, ale neposkytované materiály

Vhodné zkumavky pro barvení buněk (např. 12 x 75 mm)
Komerční lyzační roztok
Fosfátový pufr (PBS)
Izotypová kontrola (myši IgG1 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 reagenti 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 směrnici pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.
- Nepoužívejte reagencie po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialky před kontaminací.
- Reagencie nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Obsah vialky nesmí zmraznout.
- Nedodržení postupu měření může ovlivnit výsledky testu.
- Reagencie obsahuje azid sodný (Na₃N), 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 x 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

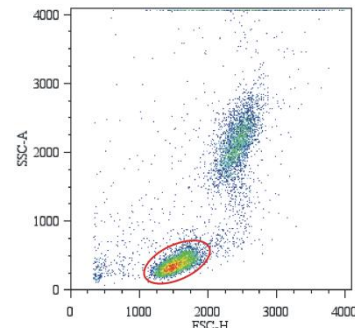
Postup barvení

- Pipetujte 20 µl reagencie CD4 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.
- Proveďte 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.
- Analýzujte 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

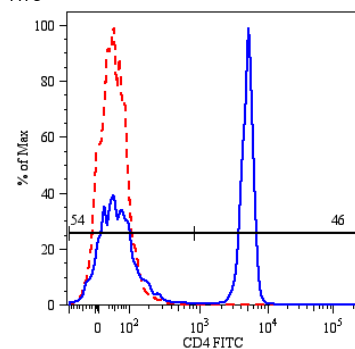
Vzorek obarvený pomocí reagencie CD4 FITC analyzujte průtokovým cytometrem. Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1.

Obr. 1: Ohraničení populace lymfocytů



Ohraničené lymfocyty vynesete do histogramu, kde osa x představuje intenzitu fluorescence FITC (viz Obr. 2). Oddělte pozitivní a negativní populace pomocí vhodných regionů a vypočtete procento CD4 pozitivních lymfocytů. Region odpovídající negativním buňkám je doporučeno předem nastavit pomocí vhodné izotypové kontroly (myši IgG1 značená FITC). Izotypová kontrola pomůže odhadnout úroveň nespecifických vazeb značené protilátky na buňky.

Obr. 2: Lymfocyty obarvené pomocí reagencie CD4 FITC



10. Vlastnosti analytické funkce

Specifická

Monoklonální protilátka MEM-241 rozpoznává koreceptor CD4, 55 kDa transmembránový glykoprotein exprimovaný na subpopulacích T lymfocytů, na monocytech, tkáňových makrofáziích a granulocytech. Specifická monoklonální protilátka MEM-241 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciacích antigenech (HLDA8 (HCDM) WS Code: M241).

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 CD4 FITC testována na 40 krevních vzorcích zdravých jedinců. Získané hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Parametr	Průměr (%)	SD	CV (%)
CD4+ lymfocyty	43,5	8,3	19,1

12. Odkazy

Yi H et al. (2006) The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. Cell Mol Immunol. 3: 189-195

Zola H et al. (2006) CD molecules 2006-human cell differentiation molecules. J Immunol Methods. 319: 1-5

Huang Y and Wange RL (2004) T cell receptor signaling: beyond complex complexes. J Biol Chem. 279: 28827-28830

Nakamura Y et al. (2004) Intrathyroidal CD4⁺ T lymphocytes express high levels of Fas and CD4⁺CD8⁺ macrophages/dendritic cells express Fas ligand in autoimmune thyroid disease. Thyroid 14: 819-824

Brdickova N. et al. (2003) LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. J Exp Med. 198:1453-62

Clapham PR and McKnight A (2002) Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. J Gen Virol. 83: 1809-29

Foti M et al. (2002) p56Lck anchors CD4 to distinct microdomains on microvilli. Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 2008-13

Nam K-H et al. (2000) Peripheral blood extrathymic CD4⁺CD8⁺ T cells with high cytotoxic activity are from the same lineage as CD4⁺CD8⁻ T cells in cynomolgus monkeys. Int Immunol. 12: 1095-1103

Millan J et al. (1999) CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. Tissue Antigens. 53: 33-40

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, ED7013_IFU_v1
První vydání.
- Verze 2, ED7013_IFU_v2
Sloučení tří jazykových mutací do jednoho dokumentu. Změna adresy: "Nad Safinou II 341".
- Verze 3, ED7013_IFU_v3
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 směrnici pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.“ - přidáno.
- Verze 4, ED7013_IFU_v4
V sekci popis reagencie byl přidán text "stabilizační" a "roztok", byl odstraněn 0,2% (hmotn./obj.) hovězí sérový albumin (BSA) jako stabilizační činidlo.
- Verze 5, ED7013_IFU_v5
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.

exbio

Monoklonální protilátka proti CD4, konjugovaná s FITC (CD4 FITC)

100 testů | Kat. č. ED7013



Návod k použití

Verze: ED7013_IFU_v5_CS

Datum vydání: 12-06-2020

CS

Symbols



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. nenese 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.