

# Monoklonální protilátka proti CD3, konjugovaná s PE (CD3 PE)

Kat. č. ED7002

## 1. Určený účel prostředku

Reagencie CD3 PE je určena k identifikaci a počítání CD3 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 protilátka proti lidskému antigenu CD3 (klon MEM-57), která byla purifikována a označena R-phycoerythrinem (PE). 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	CD3
Klon	MEM-57
Izotyp	Myší IgG2a
Fluorochrom	PE
λ excitace	488 nm
Emission maximum	575 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 PE)

## 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 reagencí uchovávejte v temnu při teplotě 2-8 °C. Nezmrazujte. Nerozplňujte 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 reagencii po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialky před kontaminací.
- Reagencii nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Obsah vialky nesmí zmraznout.
- Nedodržení postupu měření může ovlivnit výsledky testu.
- Reagencie obsahuje azid sodný (NaN<sub>3</sub>), který je v čistém stavu vysoce toxický, avšak koncentrace, která je v této reagencii (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 × 10<sup>6</sup> 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 seřazen 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

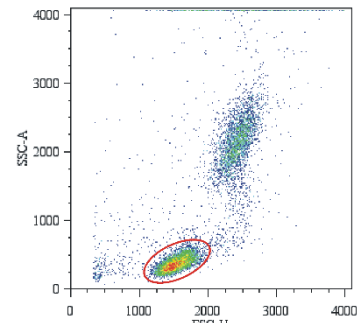
### Postup barvení

- Pipetujte 20 µl reagencie CD3 PE 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

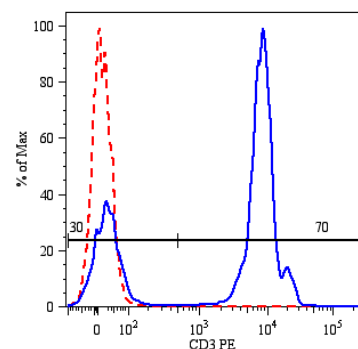
Vzorek obarvený pomocí reagencie CD3 PE analyzujte průtokovým cytometrem. Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1.

Obr. 1: Ohraničení populace lymfocytů



Ohraničené lymfocyty vynesete do histogramu, kde osa x představuje intenzitu fluorescence PE (viz Obr. 2). Oddělte pozitivní a negativní populace pomocí vhodných regionů a vypočtete procento CD3 pozitivních lymfocytů. Region odpovídající negativním buňkám je doporučeno předem nastavit pomocí vhodné izotypové kontroly (myší IgG2a značená PE). Izotypová kontrola pomůže odhadnout úroveň nespecifických vazeb značené protilátky na buňky.

Obr. 2: Lymfocyty obarvené pomocí reagencie CD3 PE



## 10. Vlastnosti analytické funkce

### Specifická

Monoklonální protilátka MEM-57 reaguje s dimery gama-epsilon a delta-epsilon lidského komplexu CD3, který je součástí velkého multipodjednotkového komplexu antigenně specifického receptoru (CD3/TCR). Tento receptor je exprimován na povrchu zralých thymocytů a T lymfocytů vyskytujících se v periferní krvi. Specifická monoklonální protilátka MEM-57 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciačních antigenech (HLDA4 WS Code: T 96).

## 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 CD3 PE testována na 40 krevních vzorcích zdravých jedinců. Získané hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Parametr	Průměr (%)	SD	CV (%)
CD3+ lymfocyty	72,4	7,2	9,9

## 12. Odkazy

Alarcon B et al. (2006) T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. EMBO Rep. 7: 490-5

Kuhns MS et al. (2006) Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. Immunity 24:133-9

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

Hilgert I. et al. (1993) Therapeutic in vivo use of the A1-CD3 monoclonal antibody. Transplantation 55: 435

Horejsi V. et al. (1988) Monoclonal antibodies against human leucocyte antigens. II. Antibodies against CD45 (T200), CD3 (T3), CD43, CD10 (CALLA), transferrin receptor (T9), a novel broadly expressed 18-kDa antigen (MEM-43) and a novel antigen of restricted expression (MEM-74). Folia Biol. (Praha) 34: 23

Leukocyte Typing IV., Knapp W. et al. (Eds.), Oxford University Press (1989); p. 293.

Leukocyte Typing III., McMichael M.J. et al. (Eds.), Oxford University Press (1987); p.611.

## 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, ED7002\_IFU\_v1  
První vydání.
- Verze 2, ED7002\_IFU\_v2  
Sloučení tří jazykových mutací do jednoho dokumentu.
- Verze 3, ED7002\_IFU\_v3  
Změna adresy: "Nad Safinou II 341".
- Verze 4, ED7002\_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, ED7002\_IFU\_v5  
V sekci výstrahy, předběžná opatření a omezení byl přidán text "stabilizační" a "roztok", byl odstraněn 0,2% (hmot./obj.) hovězí sérový albumin (BSA) jako stabilizační činidlo.
- Verze 6, ED7002\_IFU\_v6  
Změna loga výrobce. Změna grafického designu a celkového rozložení návodu k použití. Přidáno omezení pro skladování: "Chránit před slunečním zářením".  
Změna PSC výrobce z 25242 na 25250.

# exbio

## Monoklonální protilátka proti CD3, konjugovaná s PE (CD3 PE)

100 testů | Kat. č. ED7002



### Návod k použití

Verze: ED7002\_IFU\_v6\_CS

Datum vydání: 14-05-2020

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](http://www.exbio.cz). EXBIO, EXBIO Logo a všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti EXBIO Praha, a.s.