KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE

Kat. č. ED7056

1. Určený účel prostředku

KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE je diagnostický zdravotnický prostředek, který je určený pro nastavení optimálního ohraničení lymfocytů (lymphocyte gate) při imunofenotypizaci lymfocytů v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie.

2. Princip testu

Tento test je založen na specifické vazbě monoklonálních protilátek na antigeny, které jsou exprimovány na povrchu leukocytů. Monoklonální protilátky jsou značené odlišnými fluorescenčními značkami, které jsou excitovatelné zdrojem záření. Během analýzy vzorku průtokovým cytometrem je detekována emise fluorescence jednotlivých buněk. Rozdíly v emisi záření fluorochromů umožňují separovat skupiny leukocytů na základě rozdílné exprese analyzovaných antigenů.
Specifické barvení leukocytů probíhá v periferní krvi. Po inkubaci vzorku se značenými protilátkami jsou červené krvinky odstraněny pomocí lyze a leukocyty jsou analyzovány průtokovým cytometrem.

3. Poskytované materiály

Reagencie obsahuje směs dvou myších monoklonálních protilátek: protilátka proti lidskému antigenu CD45 (klon MEM-28) je značená fluorescein isothiokyanátem (FITC) a protilátka proti lidskému antigenu CD14 (klon MEM-15) je značená R-phycoerythrinem (PE). Značené protilátky byly naředěny na optimální koncentrace do stabilizačního roztoku, který obsahuje PBS a 15mM azid sodný. Obsah vialky (1 ml reagencie) odpovídá provedení 50 testů.

Specifikace produktu

Obsah	50 testů, 1 ml	
Použití	20 µl na test	
Specificita	CD45	CD14
Klon	MEM-28	MEM-15
Izotyp (myší)	IgG1	IgG1
Fluorochrom	FITC	PE
λ excitace	488 nm	488 nm
Emisní maximum	525 nm	575 nm

4. Nutné, ale neposkytované materiály

Vhodné zkumavky pro barvení buněk (např. 12 × 75 mm)
Komerční lyzační roztok
PBS pufr

5. Nutná zařízení

Automatické pipety s jednorázovými špičkami
Vortex
Centrifuga
Průtokový cytometr s excitačním laserem 488 nm a vhodnými filtry

6. Skladování a manipulace

Vialku s reagencií 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 reagencii před kontaminací.
- Reagencii nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Obsah vialky nesmí zmrznout.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nedodržení postupu značení a analýzy může ovlivnit výsledky testu.
- Reagencie obsahuje azid sodný (NaN3), který je v čistém stavu vysoce toxický, avšak koncentrace, která je v této reagencii (15 mM), není již považována za nebezpečnou. Při likvidaci reagencie nařeďte velkým množstvím vody a spláchněte do výlevky.
- Koncentrace značených protilátek v reagencii byla optimalizována s cílem nejlepšího poměru specifického signálu k nespecifickému signálu. Z tohoto důvodu je důležité dodržovat doporučený poměr objemu reagencie a objemu vzorku v každém testu. Reagencii neřeďte.
- Nepoužívejte jiný objem reagencie, než jak je uvedeno v tomto návodu k použití.
- 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 5×10^6 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.

8. Vzorek

Použijte vzorek periferní krve odebraný do sterilní zkumavky s antikoagulantem (heparin nebo EDTA).
Skladujte před obarvením za laboratorní teploty. Krev musí být obarvena do 48 hod od odběru.

9. Postup

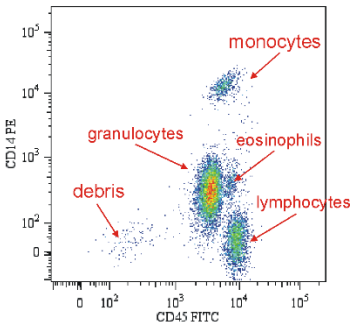
Postup značení

1. Pipetujte 20 µl reagencie KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE do zkumavky.
2. Přidejte 100 µl periferní krve a směs promíchejte pomocí vortexu.
3. Inkubujte zkumavku 15 - 20 minut v temnu za laboratorní teploty.
4. Proveďte lyzi červených krvinek pomocí komerčního lyzačního roztoku, který obsahuje formaldehyd fixující buňky. Postupujte podle návodu výrobce lyzačního roztoku.
5. Centrifugujte zkumavky 5 minut při 300 g.
6. Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 3-4 ml PBS.
7. Centrifugujte zkumavky 5 minut při 300 g.
8. Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 0,1-0,5 ml PBS.
9. Analyzujte vzorek ihned po obarvení pomocí průtokového cytometru. V případě, že byl vzorek fixován formaldehydem, je možné vzorek uskladnit v temnu při 2–8°C a analyzovat do 24 hodin.

Analýza v průtokovém cytometru

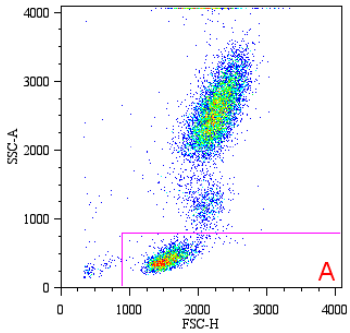
Analyzujte obarvený vzorek pomocí průtokového cytometru vybaveného excitačním laserem 488 nm a vhodnými filtry. Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat.
Následující postup nastavení optimálního ohraničení lymfocytů (lymphocyte gate) je doporučený, avšak je možné postupovat i jiným způsobem. Na obrázku 1 je znázorněno umístění populací leukocytů v zobrazení CD45 FITC vs. CD14 PE.

Obr. 1: Leukocyty obarvené reagencií KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE

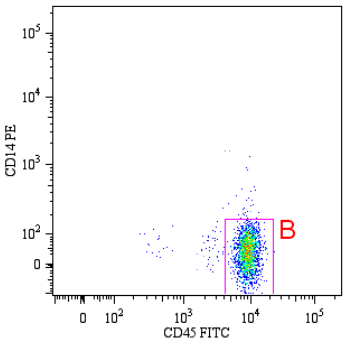


1. Data poté zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 2. Region A by měl být dostatečně velký, aby zahrnoval všechny lymfocyty.
2. Zobrazte události z regionu A v grafu CD45 FITC vs. CD14 PE. Vytvořte region B ohraničující lymfocyty, jak je znázorněno na obrázku 3. Při tomto zobrazení dat je oddělena populace lymfocytů od debrisu a monocytů, které v předchozím zobrazení (Obr. 2) nešly spolehlivě oddělit.
3. Zobrazte události z regionu B v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Nastavte optimální ohraničení populace lymfocytů (region C). Toto ohraničení je platné pouze pro data naměřená se stejným vzorkem krve a za stejných experimentálních podmínek.

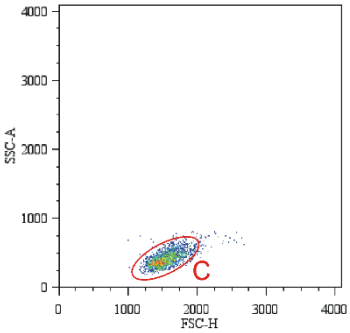
Obr. 2: Ohraničení lymfocytů pomocí regionu A



Obr. 3: Události z regionu A. Lymfocyty jsou ohraničeny regionem B.



Obr. 4: Nastavení optimálního ohraničení lymfocytů. Zobrazeny jsou události z regionu B.



10. Vlastnosti analytické funkce

Specificita

Monoklonální protilátka MEM-28 reaguje se všemi izoformami molekuly CD45. Fosfotyrosinfosfatasa CD45 (Leucocyte Common Antigen) je jednořetězcový transmembránový protein o molekulové hmotnosti 180-220 kDa, exprimovaný ve velkém množství u všech buněk hemotopoetického původu kromě erytrocytů a krevních destiček. Specificita monoklonální protilátky MEM-28 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciačních antigenech (HLDA3 WS Code: NL 833a).
Monoklonální protilátka MEM-15 reaguje s molekulou CD14, membránovým glykoproteinem o molekulové hmotnosti 53-55 kDa zakotveným pomocí glycosylfosfatidylinositolu, exprimovanou monocyty, makrofágy a slabě i granulocyty. Protilátka MEM-15 reaguje také s rozpustnou formou CD14, která se nalézá v séru a moči některých nefrotických pacientů. Specificita monoklonální protilátky MEM-15 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciačních antigenech (HLDA3 WS Code: M 252).

11. Vlastnosti klinické funkce

Očekávané hodnoty

N/A

12. Odkazy

Dawes R, Petrova S, Liu Z, Wraith D, Beverley PC, Tchilian EZ. Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. J Immunol. 2006 Mar 15;176(6):3417-25.

Fernández-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, López-Bermejo A, Ricart W: CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Apr;88(4):1780-4.

Horejsi V, Angelisova P, Bazil V, Kristofova H, Stoyanov S, Stefanova I, Hausner P, Vosecky M, Hilgert I: 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). 1988;34(1):23-34.

Leukocyte Typing III., McMichael A. J. et al (Eds.), Oxford University Press (1987).

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

Leukocyte Typing V., Schlossman S. et al. (Eds.), Oxford University Press (1995).

Leukocyte Typing VI., Kishimoto T. et al. (Eds.), Garland Publishing Inc. (1997).

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, ED7056_IFU_v1
První vydání
- Verze 2, ED7056_IFU_v2
V sekci popis reagencie byl přidán text "stabilizační" a "roztok", byl odstraněn 0,2% (hmotn./obj.) hovězí sérový albumin (BSA) jako stabilizační činidlo."
- Verze 3, ED7056_IFU_v3
Změna loga výrobce. Změna grafického designu a celkového rozložení návodu k použití. Texty "Uchovávejte v temnu", "Nerozplňujte do alikvotů" byly přidány do sekce Skladování a manipulace. Změna PSČ výrobce z 25242 na 25250.

KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE

50 testů | Kat. č. **ED7056**

IVD CE

Návod k použití

Verze: ED7056_IFU_v3_CS
Datum vydání: 13-12-2020

CS

Symboly

REF	Katalogové číslo
LOT	Kód dávky
	Použít do data
	Omezení teploty
	Chránit před slunečním zářením
IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*
CE	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..