

# KOMBITEST CD3 FITC/ CD8 PE

Kat. č. ED7051

## 1. Určený účel prostředku

KOMBITEST CD3 FITC / CD8 PE je reagencie určená pro identifikaci a počítání zralých supresorových / cytotoxických T lymfocytů (CD3+CD8+) 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 emisí záření fluorochromů umožňují separovat skupiny leukocytů na základě rozdílné exprese analyzovaných antigenů.

Specifické barvení leukocytů probíhá ve vzorku periferní krve. 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 CD3 (klon UCHT1) je značená fluorescein isothiokyanátem (FITC) a protilátka proti lidskému antigenu CD8 (klon MEM-31) 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	
Specifita	CD3	CD8
Klon	UCHT1	MEM-31
Izotyp (myši)	IgG1	IgG2a
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 x 75 mm)  
Lyzační roztok EXCELLYSE Easy (Kat. č. ED7066)

## 5. Nutná zařízení

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

## 6. Skladování a manipulace

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

## 7. Výstrahy, předběžná opatření a omezení

- 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.
- Nepoužívejte reagencii po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte reagencii před kontaminací.
- Reagencii nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Obsah vialky nesmí zmraznout.
- 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 (NaN<sub>3</sub>), který je v čistém stavu vysoce toxický, avšak koncentrace, která je v této reagií (15 mM), není již považována za nebezpečnou. Při likvidaci reagencie naředte velkým množstvím vody a spláchněte do výlevky.
- Koncentrace značených protilátek v reagií 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. Reagií neředte.
- 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 x 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 seřízen a udržován.

## 8. Vzorek

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

## 9. Postup

### Postup značení

- Pipetujte 20 µl reagencie KOMBITEST CD3 FITC / CD8 PE do zkumavky.
- Přidejte 100 µl periferní krve a směs promíchejte pomocí vortexu.
- Inkubujte zkumavku 15-20 minut v temnu za laboratorní teploty.
- Provedte lyzi červených krvinek pomocí lyzačního roztoku EXCELLYSE Easy (kat. č. ED7066) nebo jiného komerčního lyzačního roztoku, který obsahuje formaldehyd fixující buňky. Postupujte podle návodu výrobce lyzačního roztoku.
- Analýzujte 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.

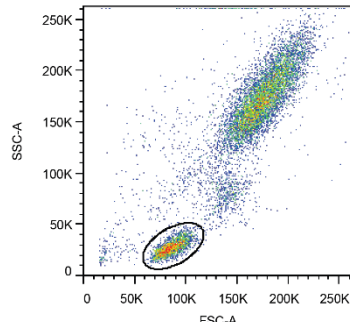
### Analýza na průtokovém cytometru

Analýzujte obarvený vzorek pomocí průtokového cytometru s excitačním laserem 488 nm a vhodnými filtry.

Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat.

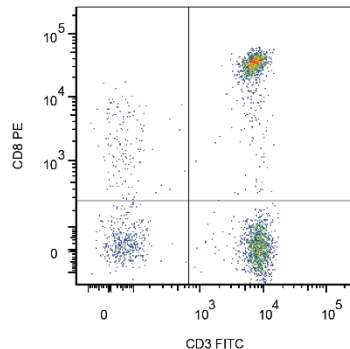
Kompenzovaná data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1. Ohraničení lymfocytů lze alternativně nastavit pomocí reagencie KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE (doporučený postup nastavení je uveden v návodu k použití).

### Obr. 1: Ohraničení lymfocytů



Poté zobrazte ohraničené lymfocyty v grafu CD3 FITC versus CD8 PE. Separujte jednotlivé populace lymfocytů pomocí vhodné nastavených regionů, jak je znázorněno na obrázku 2 a spočítejte procentuální zastoupení supresorových / cytotoxických T lymfocytů (CD3+CD8+), které se nacházejí v pravém horním kvadrantu grafu.

### Obr. 2: Lymfocyty v grafu CD8 PE vs. CD3 FITC



## 10. Vlastnosti analytické funkce

### Specifita

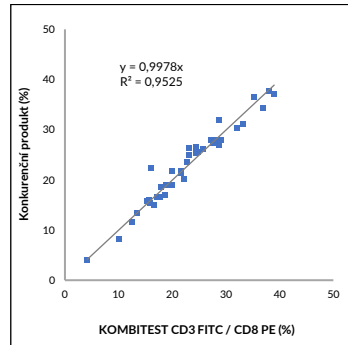
Monoklonální protilátka UCHT1 rozpoznává CD3 antigen TRC/CD3 komplexu na zralých lidských T lymfocytech. Tato protilátka specificky reaguje s epsilon řetězcem CD3 komplexu.  
HLDA I; WS Code T 3  
HLDA III; WS Code T 126  
HLDA III; WS Code T 471  
HLDA VI; WS Code T 6T-CD3.1

Monoklonální protilátka MEM-31 rozpoznává konformačně závislý epitop glykoproteinu CD8, který zprostředkovává mezibuněčné interakce v rámci imunitního systému. CD8 (monomer 32-34 kDa) se vyskytuje ve formě homodimeru CD8α/α u paměťových T lymfocytů, intraepiteliálních lymfocytů, přirozených zabíječů (NK) a dendritických buněk, nebo ve formě heterodimeru CD8α/β u většiny cytotoxických T lymfocytů a thymocytů.  
HLDA3 WS Code: T 575

### Správnost

Přesnost měření byla ověřena srovnáním reagencie KOMBITEST CD3 FITC / CD8 PE s konkurenčním produktem paralelním měřením 43 vzorků krve. Výsledky regresní analýzy jsou uvedené v následujícím grafu.

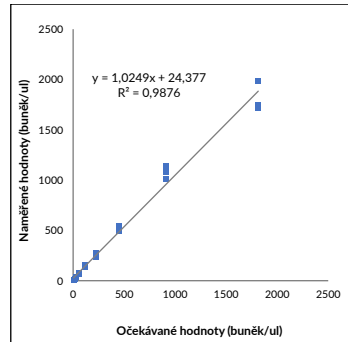
### Regresní analýza CD3+CD8+ lymfocytů



### Linearita

Linearita měření byla ověřena pomocí desetibodové ředící řady krevního vzorku obohaceného o leukocyty (buffy coat). Vzorky ředící řady byly obarveny pomocí reagencie KOMBITEST CD3 FITC / CD8 PE v triplikátech a analyzovány. Naměřené a očekávané hodnoty byly vyjádřeny jako absolutní počet (buněk/µl) v následujícím grafu.

### Rozsah CD3+CD8+ lymfocytů



### Opakovatelnost

Opakovatelnost měření byla testována na stabilizovaném krevním vzorku (Immuno-Troll™ Cells, Beckman-Coulter), který byl za stejných experimentálních podmínek obarven a změřen 10x. Koeficient variance (CV) je uveden v následující tabulce.

Subpopulace lymfocytů	Jednotka	n	Průměr	SD	CV
CD3+CD8+	%	10	25,5	1,81	7,10

### Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost měření byla testována na stabilizovaném krevním vzorku (Immuno-Troll™ Cells, Beckman-Coulter) za stejných experimentálních podmínek po dobu čtyř týdnů. Koeficient variance (CV) je uveden v následující tabulce.

Subpopulace lymfocytů	Jednotka	n	Průměr	SD	CV
CD3+CD8+	%	14	26,0	1,60	6,15

## 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. Data změřená v naší laboratoři jsou uvedena v následující tabulce.

Subpopulace lymfocytů	Jednotka	n	Průměr	95% rozsah
CD3+CD8+	%	108	25	13-46

## 12. Odkazy

Alarcón B, Swamy M, van Santen HM, Schamel WW: T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. EMBO Rep. 2006 May;7(5):490-5.

Arnett KL, Harrison SC, Wiley DC: Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 16;101(46):16268-73.

Barclay, Brown et al.: The Leukocyte Antigen FactsBook, 2nd edition, Harcourt Brace & Company, London, (1997).

Brdicková N, Brdicka T, Angelisová P, Horváth O, Spicka J, Hilgert I, Paces J, Simeoni L, Kliche S, Merten C, Schraven B, Horejsí V: LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. J Exp Med. 2003 Nov 17;198(10):1453-62.

Devine L, Thakral D, Nag S, Dobbins J, Hodsdon ME, Kavathas PB: Mapping the binding site on CD8 beta for MHC class I reveals mutants with enhanced binding. J Immunol. 2006 Sep 15;177(6):3930-8.

Drbal K, Moertelmaier M, Holzhauser C, Muhammad A, Fuertbauer E, Howorka S, Hinterberger M, Stockinger H, Schütz GJ: Single-molecule microscopy reveals heterogeneous dynamics of lipid raft components upon TCR engagement. Int Immunol. 2007 May;19(5):675-84.

Huang Y, Wange RL: T cell receptor signaling: beyond complex complexes. J Biol Chem. 2004 Jul 9;279(28):28827-30.

Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC: Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. Immunology. 2006 Feb;24(2):133-9.

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

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

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

Pang DJ, Hayday AC, Bijlmakers MJ.: CD8 Raft localization is induced by its assembly into CD8alpha beta heterodimers, Not CD8alpha alpha homodimers. J Biol Chem. 2007 May 4;282(18):13884-94.

Rieux-Laucat F, Hivroz C, Lim A, Mateo V, Pellier I, Selz F, Fischer A, Le Deist F: Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. N Engl J Med. 2006 May 4;354(18):1913-21.

Torres PS, Alcover A, Zapata DA, Arnaud J, Pacheco A, Martin-Fernández JM, Villasevil EM, Sanal O, Regueiro JR: TCR dynamics in human mature T lymphocytes lacking CD3 gamma. J Immunol. 2003 Jun 15;170(12):5947-55.

van den Berg HA, Wooldridge L, Laugel B, Sewell AK: Coreceptor CD8-driven modulation of T cell antigen receptor specificity. J Theor Biol. 2007 Nov 21;249(2):395-408.

## 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

Immuno-Troll™ Cells je registrovaná značka společnosti Beckman-Coulter.

## 15. Historie revizí

- Verze 1, ED7051\_IFU\_v1

První vydání

- Verze 2, ED7051\_IFU\_v2

Odstranění textu v sekci Popis reagensie:

"(pH 7,4)" a "0,2% hovězí sérový albumin";  
15mM Na<sub>3</sub> nahrazeno 15mM azid sodný

- Verze 3, ED7051\_IFU\_v3

Změna loga výrobce. Změna grafického designu a celkového rozložení návodu k použití.

Texty "Nezmrazujte", "Nerozplňujte do alikvotů" a "Doba použitelnosti reagensie je vyznačena na štítku vialky a na vnějším obalu" byly přidány do sekce Skladování a manipulace.

Texty "Reagensii neředte" a "Nepoužívejte jiný objem reagensie, než jak je uvedeno v tomto návodu k použití" byly přidány do sekce Výstrahy, předběžná opatření a omezení.

Byla přidána sekce Ochranné známky.

Sekce Postup značení byla změněna - bylo přidáno použití lyzačního roztoku Excellise Easy (Kat. č. ED7066), promývací kroky po lyzi červených krvinek (kroky 5 - 8 v předchozí verzi) byly nahrazeny postupem dle návodu k použití od výrobce použitého lyzačního činidla.

- Verze 4, ED7051\_IFU\_v4

Byla přidána literatura do sekce Odkazy. Byl upřesněn text definující omezení použití produktu.

# exbio

## KOMBITEST CD3 FITC / CD8 PE

50 testů | Kat. č. ED7051



### Návod k použití

Verze: ED7051\_IFU\_v4\_CS

Datum vydání: 04-02-2020

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. 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..