

KOMBITEST CD4 FITC / CD8 PE

Kat. č. ED7052

1. Určený účel prostředku

KOMBITEST CD4 FITC / CD8 je určený pro identifikaci a počítání zralých pomocných/induktorových (CD4+) a supresorových/cytotoxických (CD8+) lymfocytů v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie. Současně může být stanoven poměr pomocných a supresorových lymfocytů (CD4+ / CD8+).

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 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 CD4 (klon MEM-241) je značená fluorescein isothiokyanátem (FITC) a protilátka proti lidskému antigenu CD8 (klon MEM-31) je značená R-phycoerythrinem (PE). Značené protilátky byly na optimální koncentraci 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	
Specifická	CD4	CD8
Klon	MEM-241	MEM-31
Izotyp (mysi)	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)
Lyzací roztok EXCELLYSE Easy (Kat. č. ED7066)
PBS pufr
Deionizovaná voda

5. Nutná zařízení

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

6. Skladování a manipulace

Vialku s reagencí uchovávejte v temnu při teplotě 2 - 8 °C. Nezmrzávejte. 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 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 zmznout.
- 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 naředte velkým množstvím vody a spláchněte do vývěvy.
- 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 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 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.

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

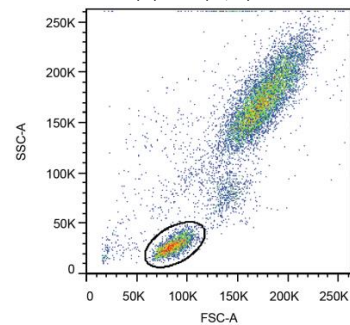
Postup značení

- Pipetujte 20 µl reagencie KOMBITEST CD4 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.
- 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 0,1-0,5 ml PBS.
- 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 v průtokovém cytometru

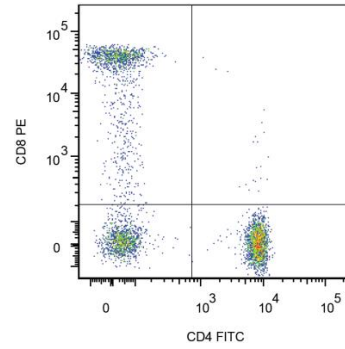
Analýzujte obarvený vzorek pomocí průtokového cytometru s excitačním laserem 488 nm a vhodnými filtry.
Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat.
Kompenzovaná data zobraďte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC).
Ohraničte populaci lymfocytů (Obrázek 1).
Ohraničení lymfocytů lze alternativně nastavit pomocí reagencie KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE (doporučený postup nastavení je uveden v návodu k použití).

Obr. 1: Ohraničení populace lymfocytů



Poté zobraďte ohraničené lymfocyty v grafu CD4 FITC versus CD8 PE (Obrázek 2). Separujte jednotlivé populace lymfocytů pomocí vhodné nastavených regionů a spočítejte procentuální zastoupení pomocných/induktorových lymfocytů umístěných v pravém spodním kvadrantu (CD4+ CD8-) a supresorových/cytotoxických lymfocytů umístěných v levém horním kvadrantu (CD4- CD8+).

Obr. 2: Lymfocyty v grafu CD8 PE vs. CD4 FITC



10. Vlastnosti analytické funkce

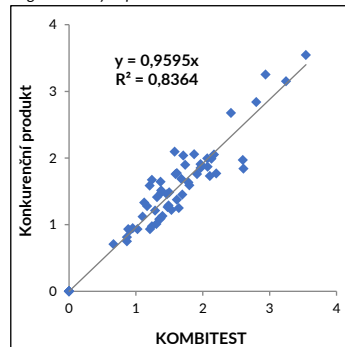
Specifická

Monoklonální protilátka MEM-241 rozpoznává koreceptor CD4, 55 kDa transmembránový glykoprotein exprimovaný na subpopulacích T lymfocytů, na monocitech, tkáňových makrofázích a granulocytech. Specifická monoklonální protilátka MEM-241 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciačních antigenech (HLDA8 (HCDM) WS Code: M241).
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. Specifická monoklonální protilátka MEM-31 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciačních antigenech (HLDA3 WS Code: T 575).

Správnost

Správnost měření byla ověřena srovnáním reagencie KOMBITEST CD4 FITC / CD8 PE s konkurenčním produktem paralelním měřením 61 vzorků krve. Výsledky regresní analýzy jsou v grafické podobě uvedené níže.

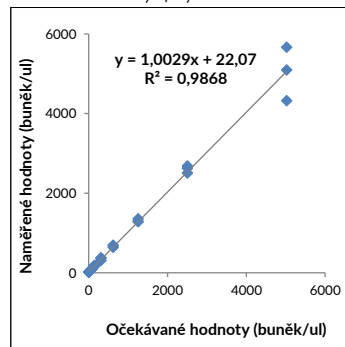
Regresní analýza poměru CD4/CD8



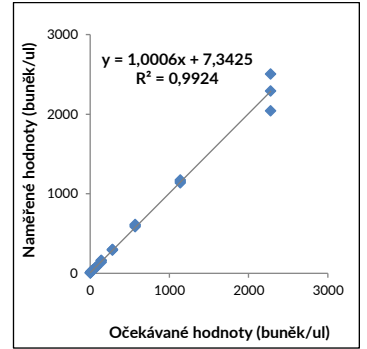
Linearita

Linearita měření byla ověřena pomocí desetibodové řady krevního vzorku obohaceného o leukocyty (buffy coat). Vzorky řady byly obarveny pomocí reagencie KOMBITEST CD4 FITC / CD8 PE v triplikátech a analyzovány. Naměřené a očekávané hodnoty byly vyjádřeny jako absolutní počet (buněk/µl) v následujících grafech.

Rozsah CD4+CD8- Lymfocytů



Rozsah CD4 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. Variační koeficient (CV) je uveden v následující tabulce.

Subpopulace Lymfocytů	n	Průměr	SD	CV
CD4+CD8- (%)	10	42,7	1,27	2,97
CD4-CD8+ (%)	10	30,7	1,12	3,65

Reprodukovatelnost

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

Subpopulace Lymfocytů	n	Průměr	SD	CV
CD4+CD8- (%)	14	42,9	1,87	4,36
CD4-CD8+ (%)	14	30,5	1,04	3,43

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	n	Průměr	95% interval
CD4+CD8- (%)	61	44	27-61
CD4-CD8+ (%)	61	28	14-43
CD4/CD8 poměr	61	1,7	0,8-3,5

12. Odkazy

Anderson AE, Sayers BL, Haniffa MA, Swan DJ, Diboll J, Wang XN, Isaacs JD, Hilken CM: Differential regulation of naive and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2008 Jul;84(1):124-33.

Brdicková N, Brdická T, Angelisová P, Horváth O, Spicka J, Hilgert I, Paces J, Simeoni L, Kliche S, Merten C, Schraven B, Horejší 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.

Brdicková N. et al.: 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.

Foti M, Phelouzat MA, Holm A, Rasmuson BJ, Carpentier JL: p56Lck anchors CD4 to distinct microdomains on microvilli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99(4):2008-13.

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

Manasa J, Musabaike H, Masimirembwa C, Burke E, Luthy R, Mudzori J: Evaluation of the Partec flow cytometer against the BD FACSCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Mar;14(3):293-8.

Millan J, Cerny J, Horejší V, Alonso MA: CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. *Tissue Antigens.* 1999 Jan;53(1):33-40.

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.

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.

Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, D Buckley C, Buhning HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X: CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. J Immunol Methods. 2007 Jan 30;319(1-2):1-5.

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, ED7052_IFU_v1
První vydání
- Verze 2, ED7052_IFU_v2

Odstranění textu v sekci Popis reagentie: "(pH 7,4)" a "0,2% hovězí sérový albumin"

- Verze 3, ED7052_IFU_v3

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

Texty "Uchovávejte v temnu", "Nerozpíňujte do alikvotů" byly přidány do sekce Skladování a manipulace.

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

Postup značení byl specifikován pro použití lyzačního roztoku Excellyse Easy (Kat. č. ED7066).

exbio

KOMBITEST CD4 FITC / CD8 PE

50 testů | Kat. č. ED7052



Návod k použití

Verze: ED7052_IFU_v3_CS

Datum vydání: 18-06-2020

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..