

KOMBITEST CD3 FITC / HLA-DR PE

Kat. č. ED7055

1. Určený účel prostředku

KOMBITEST CD3 FITC / HLA-DR je In vitro diagnostický zdravotnický prostředek, který je určený pro identifikaci a počítání zralých aktivovaných T 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 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 HLA-DR (klon MEM-12) 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 tests, 1 ml	
Použití	20 µl per test	
Specifita	CD3	HLA-DR
Klon	UCHT1	MEM-12
Izotyp (myši)	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 x 75 mm)
Lyzační roztok EXCELLYSE Easy (Kat. č. ED7066)
PBS pufr
Deionizovaná voda

5. Nutná zařízení

Automatické pipety s jednorázovými špičkami
Vortex
Průtokový cytometr s excitacním 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. Souprava je ve shodě s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.
- Nepoužívejte reagencií po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte reagencií před kontaminací.
- Reagencií 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 reagencií (15 mM), není již považována za nebezpečnou. Při likvidaci reagencie naředte velkým množstvím vody a spláchněte do výlevky.
- Koncentrace značených protilátek v reagencií 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. Reagencií 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).
Skládejte před obarvením za laboratorní teploty. Krev musí být obarvena do 48 hod od odběru.

9. Postup

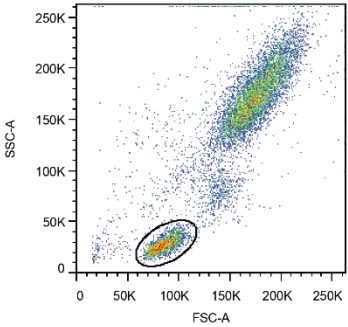
Postup značení

- Pipetujte 20 µl reagencie KOMBITEST CD3 FITC / HLA-DR PE do zkumavky.
- Přidejte 100 µl periferní krve a směs promíchejte pomocí vortexu.
- Inkubujte zkumavku 15 - 20 minut v temnu za laboratorní teploty.
- Proveďte 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.
- 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

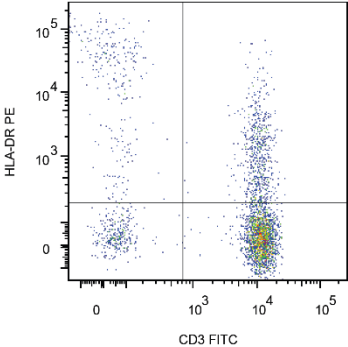
Analyzujte obarvený vzorek pomocí průtokového cytometru s excitacním laserem 488 nm a vhodnými filtry.
Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat.
Kompenzovaná data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů (Obrázek 1). Ohraničení lymfocytů 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 zobrazte ohraničené lymfocyty v grafu CD3 FITC versus HLA-DR PE (Obrázek 2). Separujte jednotlivé populace lymfocytů pomocí vhodně nastavených regionů a spočítejte procentuální zastoupení aktivovaných T lymfocytů (CD3+HLA-DR+), které se nacházejí v pravém horním kvadrantu grafu.

Obr. 2: Lymfocyty v grafu HLA-DR PE vs. CD3 FITC



10. Vlastnosti analytické funkce

Specifita

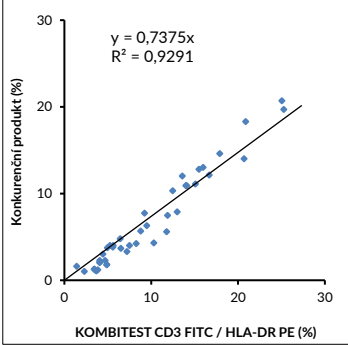
Monoklonální protilátka UCHT1 rozpoznává CD3 antigen TCR/CD3 komplexu na zralých lidských T lymfocytech. Tato protilátka specificky reaguje s epsilon řetězcem CD3 komplexu.
HLDA I; WS Code T 3
HLDA II; WS Code T 126
HLDA III; WS Code T 471
HLDA VI; WS Code T 6T-CD3.1

Monoklonální protilátka MEM-12 rozeznává epitop na lidské molekule HLA-DR, který závisí na asociaci alfa a beta řetězce. DR je isoforma lidské molekuly MHC II. typu, kterou exprimují buňky prezentující antigen, zejména B lymfocyty, monocyty, makrofágy, aktivované T lymfocyty a aktivovaní přirození zabijáci (NK).

Správnost

Správnost měření byla ověřena srovnáním reagencie KOMBITEST CD3 FITC / HLA-DR PE s konkurenčním produktem paralelním měřením 43 vzorků krve. Výsledky regresní analýzy jsou v grafické podobě uvedené níže.

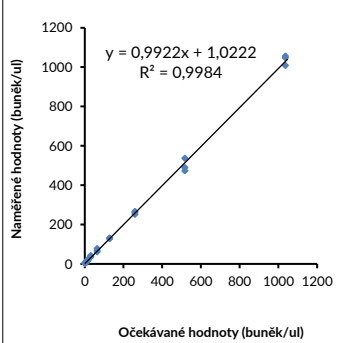
Regresní analýza CD3+HLA-DR+ Lymfocytů



Linearita

Linearita měření byla ověřena pomocí desetibodové ředící řady krevního vzorku obohačeného o leukocyty (buffy coat). Vzorky ředící řady byly obarveny pomocí reagencie KOMBITEST CD3 FITC / HLA-DR PE in triplicates. Naměřené a očekávané hodnoty byly vyjádřeny jako absolutní počet (buněk/µl) v následujícím grafu.

Rozsah CD3+HLA-DR+ 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	AVG	SD	CV
CD3+HLA-DR+ (%)	10	8,8	0,7	8,4

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	AVG	SD	CV
CD3+HLA-DR+ (%)	14	8,1	1,2	15,2

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 uvedená v následující tabulce.

Subpopulace Lymfocytů	n	Průměr	95% interval
CD3+HLA-DR+ (%)	43	9,6	2,3 – 25,0

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).

Horejsi V, Nemeš M, Angelisova P, Kristofova H, Gorga JC, Hilgert I: Characterization of seven new monoclonal antibodies against human DR, DR + DP and DQ1 + DQ3 antigens. Tissue Antigens. 1986 Nov;28(5):288-97.

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. Immunity. 2006 Feb;24(2):133-9.

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).

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, ED7055_IFU_v1
První vydání
- Verze 2, ED7055_IFU_v2
Odstranění textu v sekci Popis reagencie: "(pH 7,4)" a "0,2% hovězí sérový albumin"
- Verze 3, ED7055_IFU_v3
Změna loga výrobce. Změna grafického designu a celkového rozložení návodu k použití.
Texty "uchovávejte v temnu", "Nerozplňujte do alikvotů" a "Doba použitelnosti reagencie je vyznačena na štítku vialky a na vnějším obalu" byly přidány do sekce Skladování a manipulace.
Texty "Reagencií neředte" a "Nepoužívejte jiný objem reagencie, 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).



KOMBITEST CD3 FITC / HLA-DR PE

50 testů | Kat. č. ED7055



Návod k použití

Verze: ED7055_IFU_v3_CS

Datum vydání: 24-02-2020

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. nenes 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..