

# KOMBITEST CD3 FITC / CD19 PE

Kat. č. ED7053

## 1. Určený účel prostředku

KOMBITEST CD3 FITC / CD19 PE je diagnostický zdravotnický prostředek, který je určený pro identifikaci a počítání zralých T a B 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 CD3 (klon UCHT1) je značená fluorescein isothiokyanátem (FITC) a protilátka proti lidskému antigenu CD19 (klon 4G7) 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	
Specifická	CD3	CD19
Klon	UCHT1	4G7
Izotyp (myši)	IgG1	IgG1
Fluorochrom	FITC	PE
λ excitace	488 nm	488 nm
Emission maximum	525 nm	575 nm

## 4. Nutné, ale neposkytované materiály

Vhodné zkumavky pro barvení buněk (např. 12 x 75 mm)  
Komerční lizační 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

Vialky s reagencí uchovávejte v temnu při teplotě 2-8°C. Nezmrazujte. Nerozpíchněte do alikvotů.  
Doba použitelnosti reagencie je vyznačena na etiketě vialky a na vnější 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 (NaN<sub>3</sub>), 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 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 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 nálezitě nakládáno. Vyvarujte se kontaktu vzorků s pokožkou, očima a sliznicemi.
- V případě krevního vzorku s abnormálně vysokým počtem leukocytů je třeba vzorek naředít 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

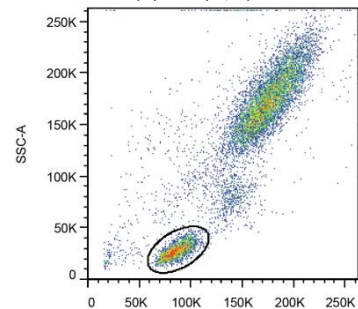
### Postup značení

- Pipetujte 20 µl reagencie KOMBITEST CD3 FITC / CD19 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 komerčního lizačního roztoku, který obsahuje formaldehyd fixující buňky. Postupujte podle návodu výrobce lizačního 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

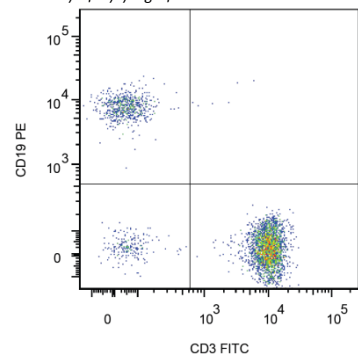
Kompenzovaná data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1. Optimální ohraničení lymfocytů lze alternativně nastavit pomocí reagencie KOMBITEST CD45 FITC / CD14 PE (doporučený postup nastavení je uveden v návodu k použití).

### Obr. 1: Ohraničení populace lymfocytů



Poté zobrazte ohraničené lymfocyty v grafu CD3 FITC versus CD19 PE. Separujte jednotlivé populace lymfocytů pomocí vhodně nastavených regionů, jak je znázorněno na obrázku 2 a spočítejte procentuelní zastoupení T lymfocytů umístěných v pravém spodním kvadrantu (CD3+CD19-) a B lymfocytů umístěných v levém horním kvadrantu (CD3-CD19+).

### Obr. 2: Lymfocyty v grafu CD3 FITC vs. CD19 PE



## 10. Vlastnosti analytické funkce

### Specifická

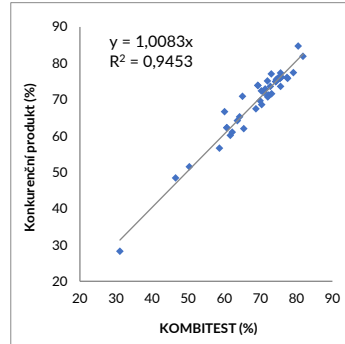
Monoklonální protilátka UCHT1 rozpoznává CD3 antigen TCR/CD3 komplexu na zralých lidských T lymfocytech. Tato protilátka specificky reaguje s epsilon řetězcem CD3 komplexu. Specifická monoklonální protilátka UCHT1 byla ověřena v rámci mezinárodních pracovních seminářů o lidských leukocytárních diferenciálních antigenech (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 4G7 reaguje s antigenem CD19 (B4), 95 kDa transmembránovým glykoproteinem typu I imunoglobulinové rodiny, který je exprimován B lymfocyty a folikulárními dendritickými buňkami. Plasmatické buňky CD19 již neexprimují (HLDA: WS Code 2 B43).

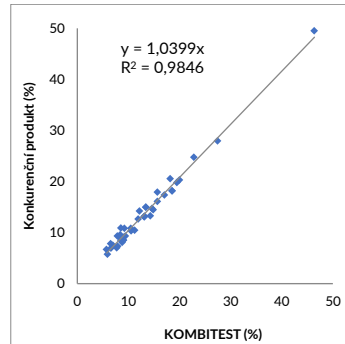
### Přesnost

Přesnost měření byla ověřena srovnáním reagencie KOMBITEST s konkurenčním produktem paralelním měřením 43 vzorků krve. Výsledky regresní analýzy v grafické podobě jsou uvedené níže.

### Regresní analýza poměrného zastoupení CD3+ / CD19- Lymfocytů



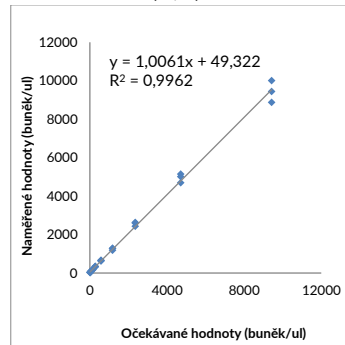
### Regresní analýza poměrného zastoupení CD3- / CD19+ Lymfocytů



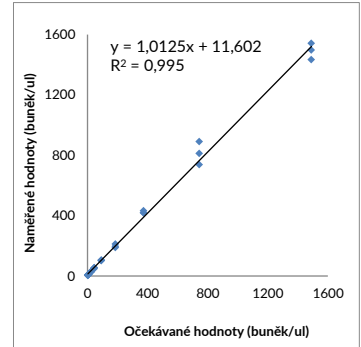
### Linearita

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

### Rozsah CD3+CD19- Lymfocytů



### Rozsah CD3-CD19+ 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	n	Průměr	SD	CV
CD3+CD19- (%)	10	70,3	0,94	1,34
CD3-CD19+ (%)	10	14,5	1,36	9,37

## 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	n	Průměr	SD	CV
CD3+CD19- (%)	14	72,7	0,97	1,34
CD3-CD19+ (%)	14	13,2	1,16	8,78

## 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
CD3+CD19- (%)	108	71	52-83
CD3+CD19- (buněk/µl)	54	1480	886-2341
CD3-CD19+ (%)	108	13	5-24
CD3-CD19+ (buněk/µl)	54	242	87-445

## 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).

Dubois B, Massacrier C, Caux C: Selective attraction of naive and memory B cells by dendritic cells. J Leukoc Biol. 2001 Oct;70(4):633-41.

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).

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.

Siegers GM, Swamy M, Fernández-Malavé E, Minguet S, Rathmann S, Guardo AC, Pérez-Flores V, Regueiro JR, Alarcón B, Fisch P, Schamel WW: Different composition of the human and the mouse gammadelta T cell receptor explains different phenotypes of CD3gamma and CD3delta immunodeficiencies. J Exp Med. 2007 Oct 29;204(11):2537-44.

Torres PS, Alcover A, Zapata DA, Arnaud J, Pacheco A, Martín-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.

### 13. Výrobce

EXBIO Praha, a.s.  
Nad Safinou II 341  
25250 Vestec  
Czech Republic

[info@exbio.cz](mailto:info@exbio.cz)  
[technical@exbio.cz](mailto:technical@exbio.cz)  
[orders@exbio.cz](mailto:orders@exbio.cz)  
[www.exbio.cz](http://www.exbio.cz)

### 14. Ochranné známky

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

### 15. Historie revizí

- Verze 1, ED7053\_IFU\_v1

První vydání

- Verze 2, ED7053\_IFU\_v2

V sekci popis reagentie byl přidán text "stabilizační" a "roztok", byl odstraněn 0,2% (hmotn./obj.) hovězí sérový albumin (BSA) jako stabilizační činidlo."

- Verze 3, ED7053\_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.

# exbio

## KOMBITEST CD3 FITC / CD19 PE

50 testů | Kat. č. ED7053



### Návod k použití

Verze: ED7053\_IFU\_v3\_CS

Datum vydání: 10-11-2020

CS

### Symbody



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..