

## KOMBITEST™ CD3 FITC / CD19 PE

Cat. No. / Kat. č.: ED7053

### ENGLISH

#### 1. Specification

Content	50 tests, 1 ml	
Usage	20 µl per test (100 µl PBL)	
Specificity	CD3	CD19
Clone	UCHT1	4G7
Isotype (mouse)	IgG1	IgG1
Fluorochrome	FITC	PE
λ excitation	488 nm	488 nm
Emission maximum	525 nm	575 nm

#### 2. Intended use

The KOMBITEST™ CD3 FITC / CD19 PE is designed for percentage enumeration of mature human T and B lymphocytes in erythrocyte-lysed whole blood using Flow Cytometry.

#### 3. Principle

This test is based on the specific binding of monoclonal antibodies to the antigenic determinants expressed on the surface of leukocytes. The monoclonal antibodies are labeled with different fluorochromes which are excited via laser beam from a flow cytometer during analysis. Subsequent emissions of light from the fluorochromes of each cell are collected and analyzed by a flow cytometer. The fluorescence intensity differences enable the separation of cell subsets based on the expression of analyzed antigens.

The specific staining of blood cells is performed by the incubation of blood samples with the reagent followed by a lysis of red blood cells. Afterwards, unaffected leukocytes are subjected to analysis by a flow cytometer.

#### 4. Reagent provided

The reagent contains a premixed combination of mouse monoclonal antibody against human CD3 antigen (clone UCHT1) labeled with Fluorescein isothiocyanate (FITC), and mouse monoclonal antibody against human CD19 antigen (clone 4G7) labeled with R-phycoerythrin (PE). Labeled antibodies are diluted at optimum concentration in stabilizing phosphate buffered saline (PBS) solution containing 15mM sodium azide. The content of a vial (1 ml) is sufficient for 50 tests.

#### 5. Storage

Store vial in the dark at 2-8°C. Do not freeze.

#### 6. Precautions

- Intended for In Vitro Diagnostic use in laboratories outside USA and Canada. This CE-IVD reagent is in conformity with the European In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/EC.
- Do not use after expiration date stamped on vial label.
- Avoid prolonged exposure to light.
- The content of the vial must not freeze.
- Avoid contamination of the reagent.
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Any non-performance of the staining protocol may produce false results.
- The reagent contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>) which is highly toxic in pure form. However, the concentration in the reagent (15mM) is not considered as hazardous. When disposing the reagent, flush the sink with a large volume of water.
- Blood samples are considered as potentially infectious and must be handled with care. Avoid all contact of the sample with the skin, eyes and mucosa.

#### 7. Necessary material not supplied

Test tubes for staining of blood samples (e.g. 12 × 75 mm), automatic pipettes with disposable tips, vortex mixer, commercial lysing solution, PBS buffer, flow cytometer.

#### 8. Blood specimen

The peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (Heparin or EDTA) must be stored at room temperature and stained within 48 hours of drawing.

#### 9. Staining protocol

- Add 20 µl of KOMBITEST™ CD3 FITC / CD19 PE reagent to a test tube.
- Add 100 µl of blood sample to the tube. Vortex the tube.
- Incubate the tube for 15-20 minutes at room temperature in the dark.
- Perform lysis of red cells using lysing solution. It is recommended to use a commercial lysing solution containing formaldehyde as a fixative. Follow the instructions of the lysing solution manufacturer.
- Centrifuge tubes for 5 minutes at 300 g.
- Remove supernatant and resuspend pellet with 3-4 ml of PBS.
- Centrifuge tubes for 5 minutes at 300 g.
- Remove supernatant and resuspend pellet with 0.1 – 0.5 ml of PBS.

- Analyze the sample immediately using a flow cytometer or store sample at 2-8°C in the dark and analyze within 24 hours provided that cells were fixed.

## 10. Flow cytometry

Analyze stained samples using a flow cytometer equipped with excitation laser 488 nm and proper filters. Compensate fluorescent signals prior to or after data acquisition.

## 11. Data analysis

Visualize compensated data on the side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) plot. Set the gate for lymphocyte population as shown in figure 1. Alternatively, set the optimal lymphocyte gate using KOMBITEST™ CD45 FITC / CD14 PE (refer the datasheet for lymphocyte gate assessment procedure). Then make a CD3 FITC versus CD19 PE dot-plot of lymphocyte population as shown in figure 2. Separate populations using appropriate gate and calculate the percentage of T lymphocytes situated in lower-right quadrant (CD3+CD19-) and B lymphocytes situated in upper-left quadrant (CD3-CD19+) on the dot-plot.

## 12. Expected values

Results obtained in different laboratories may vary. Each laboratory should establish a normal range of cell subsets using its own test conditions. Results obtained in our laboratory are given in the table below.

Lymphocyte Subset	Unit	n	Mean	95% Range
CD3+CD19-	%	108	71	52-83
	cells/μl	54	1480	886-2341
CD3-CD19+	%	108	13	5-24
	cells/μl	54	242	87-445

## 13. Performance characteristics

### Specificity

The antibody UCHT1 recognizes the CD3 antigen of the TCR/CD3 complex on mature human T cells. The UCHT1 antibody reacts with the epsilon chain of the CD3 complex.

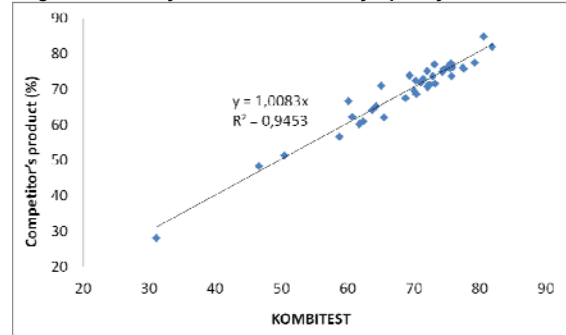
HLDA I; WS Code T 3  
 HLDA III; WS Code T 126  
 HLDA III; WS Code T 471  
 HLDA VI; WS Code T 6T-CD3.1

The mouse monoclonal antibody 4G7 recognizes CD19 (B4), a 95 kDa type I transmembrane glycoprotein of immunoglobulin superfamily, expressed on B lymphocytes and follicular dendritic cells; it is lost on plasma cells.

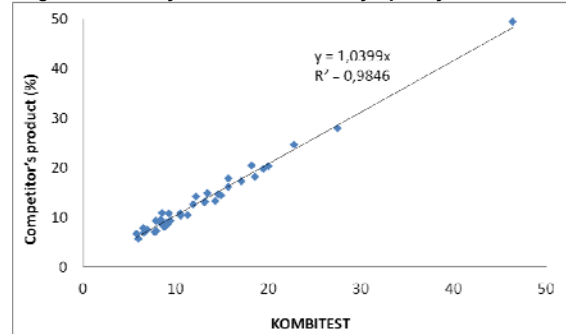
### Accuracy

The accuracy of the method was studied by the comparison of KOMBITEST™ with competitor's product in parallel staining of 43 blood samples. The regression analysis is given below.

### Regression Analysis of CD3+CD19- Lymphocytes



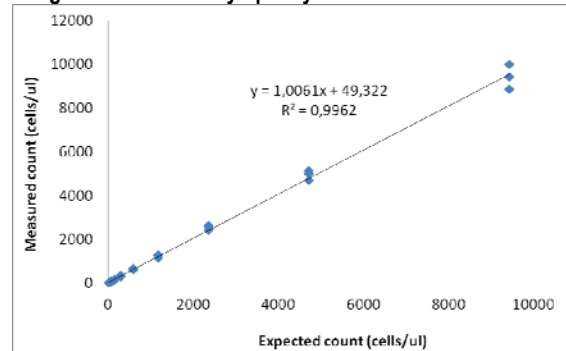
### Regression Analysis of CD3-CD19+ Lymphocytes



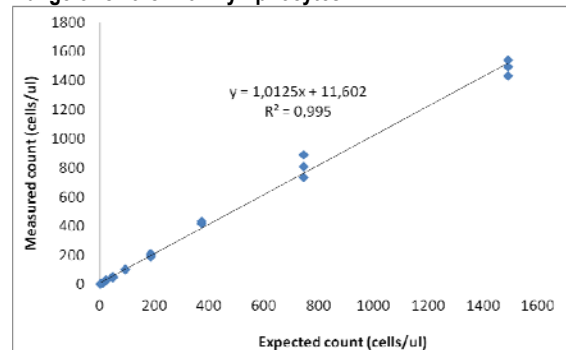
### Linearity

The linearity of the method was determined on 10 serial dilutions of leukocyte-enriched blood sample (buffy coat). Cell samples were stained by KOMBITEST™ in triplicates. Measured and expected values were expressed in terms of absolute count (cells/μl) in graphs given below.

### Range of CD3+CD19- Lymphocytes



### Range of CD3-CD19+ Lymphocytes



### Repeatability

The repeatability of the assay was measured on stabilized blood sample (Immuno-Troll™ Cells, Beckman-Coulter) in ten tubes in parallel. Coefficients of variation (CV) are given in the table below.

Lymphocyte Subset	Unit	n	Average	SD	CV
CD3+CD19-	%	10	70.3	0.94	1.34
CD3-CD19+	%	10	14.5	1.36	9.37

### Reproducibility

The reproducibility of the assay was measured on stabilized blood sample (Immuno-Troll™ Cells, Beckman-Coulter) under the same conditions for four weeks. Coefficients of variation (CV) are given in the table below.

Lymphocyte Subset	Unit	n	Average	SD	CV
CD3+CD19-	%	14	72.7	0.97	1.34
CD3-CD19+	%	14	13.2	1.16	8.78

### 14. Limitations

- Flow cytometer may produce false results if the device has not been aligned and maintained appropriately.
- Data may be incorrectly interpreted if fluorescent signals were compensated wrongly or if gates were positioned inaccurately.
- Blood samples from abnormal patients may exhibit abnormal values of positive cells.
- In case of a hyperleukocytose sample, it is recommended to dilute the blood sample with PBS to obtain leukocyte density approximately  $5 \times 10^6$  leukocytes/ml.

## 1. Specifikace produktu

Obsah	50 testů, 1 ml	
Použití	20 $\mu$ l na test (100 $\mu$ l krve)	
Specifická	CD3	CD19
Klon	UCHT1	4G7
Izotyp (myši)	IgG1	IgG1
Fluorochrom	FITC	PE
$\lambda$ excitace	488 nm	488 nm
Emisní maximum	525 nm	575 nm

## 2. Použití

KOMBITEST™ CD3 FITC / CD19 PE je In vitro diagnostický zdravotnický prostředek, který je určený pro identifikaci a počítání zralých T a B lymfocytů v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie.

## 3. Princip

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.

## 4. Popis reagentie

Reagentie 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 reagentie) odpovídá provedení 50 testů.

## 5. Skladování

Vialku s reagentií uchovávejte v temnu při teplotě 2-8°C. Doba použitelnosti reagentie je vyznačena na štítku vialky.

## 6. Upozornění

- Reagentie je určena pro In vitro diagnostiku a vyhovuje požadavkům NV 56/2015 Sb., které je harmonizováno s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.
- Nepoužívejte reagentii po uplynutí doby použitelnosti.
- Reagentii nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Obsah vialky nesmí zmraznout.
- Chraňte obsah vialky před kontaminací.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nedodržení postupu měření může ovlivnit výsledky testu.
- Reagentie obsahuje azid sodný (NaN<sub>3</sub>), který je v čistém stavu vysoce toxický, avšak koncentrace, která je v této reagentii (15 mM), není již považována za nebezpečnou.

Při likvidaci reagentie obsahující azid splachujte velkým množstvím vody.

- 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.

## 7. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

Vhodné zkumavky pro barvení buněk (např. 12 × 75 mm), sada pipet s jednorázovými špičkami, centrifuga, vortex, lyzační roztok, pufr PBS, průtokový cytometr.

## 8. Vzorek krve

Vzorek periferní krve odebraný do sterilní zkumavky s antiokoagulantem (heparin nebo EDTA) skladujte před obarvením za laboratorní teploty na kývačce. Krev musí být obarvena do 48 hod od odběru.

## 9. Postup barvení

1. Pipetujte 20 µl reagentie KOMBITEST™ CD3 FITC / CD19 PE do zkumavky.
2. Přidejte 100 µl promíchané periferní krve a směs promíchejte pomocí vortexu.
3. Inkubujte zkumavku 15-20 minut v temnu za laboratorní teploty.
4. Proveďte lyzi červených krvinek pomocí lyzačního roztoku. Je doporučeno používat komerční lyzační činidlo, které obsahuje formaldehyd fixující buňky. Postupujte podle návodu výrobce lyzačního činidla.
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.

## 10. Cytometrické měření

Analyzujte obarvený vzorek pomocí průtokového cytometru vybaveného excitačním laserem 488 nm a vhodnými filtry. Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat.

## 11. Analýza dat

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 reagentie KOMBITEST™ CD45 FITC / CD14 PE (doporučený postup nastavení je uveden v návodu k použití). 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+).

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

## 13. Analytické parametry

### 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 diferenačních 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.

### Přesnost

Přesnost měření byla ověřena srovnáním reagentie KOMBITEST™ s konkurenčním produktem paralelním měřením 43 vzorků krve. Výsledky regresní analýzy v grafické podobě jsou uvedené v anglické části tohoto návodu (kap. 13).

### Linearita

Linearita měření byla ověřena pomocí desetibodové ředící řady krevního vzorku obohaceného o leukocyty (buffy coat). Vzorky ředící řady byly obarveny pomocí reagentie KOMBITEST™ v triplicátech a analyzovány. Výsledky testování linearity měření v grafické podobě jsou uvedené v anglické části tohoto návodu (kap. 13).

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

## 14. Omezení metody

- Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není dobře seřízen a udržován.
- Data mohou být špatně interpretována, pokud jsou fluorescenční signály špatně kompenzované, případně pokud jsou regiony buněk špatně umístěné.
- Krevní vzorky od abnormálních pacientů mohou vykazovat abnormální hodnoty procent pozitivních buněk.
- V případě krevního vzorku s abnormálně vysokým počtem leukocytů je třeba vzorek naředit pomocí PBS na hodnotu kolem  $5 \times 10^6$  leukocytů na ml.

## SLOVENSKY

### 1. Špecifikácia produktu

Obsah	50 testov, 1 ml	
Použitie	20 $\mu$ l na test (100 $\mu$ l krvi)	
Špecifickosť	CD3	CD19
Klon	UCHT1	4G7
Izotyp (myšie)	IgG1	IgG1
Fluorochróm	FITC	PE
$\lambda$ excitácia	488 nm	488 nm
Emisné maximum	525 nm	575 nm

### 2. Použitie

KOMBITEST™ CD3 FITC / CD19 PE je In vitro diagnostický zdravotnícky prostriedok, ktorý je určený na identifikáciu a počítanie zreých T a B lymfocytov v ľudskej periférnej krvi pomocou prietokovej cytometrie.

### 3. Princíp

Tento test je založený na špecifickej väzbe monoklonových protilátok na antigény, ktoré sú exprimované na povrchu leukocytov. Monoklonové protilátky sú označené odlišnými fluorescenčnými značkami, ktoré sú excitovateľné zdrojom žiarenia. V priebehu analýzy vzorky prietokovým cytometrom sa zaznamená fluorescencia jednotlivých buniek. Rozdiely v emisii žiarenia fluorochrómov umožňujú separovať skupiny leukocytov na základe rozdielnej expresie analyzovaných antigénov.

Špecifické značenie leukocytov prebieha v periférnej krvi. Po inkubácii vzorky s označenou protilátkou sú červené krvinky odstránené pomocou lýzy a leukocyty sú analyzované prietokovým cytometrom.

### 4. Popis reagentie

Reagencia obsahuje zmes dvoch myších monoklonových protilátok: protilátka proti ľudskému antigénu CD3 (klon UCHT1) je označená fluoresceín izotiokyanátom (FITC) a protilátka proti ľudskému antigénu CD19 (klon 4G7) je označená R-phycoerythrinom (PE). Označené protilátky boli nariadené na optimálnu koncentráciu do stabilizačného roztoku, ktorý obsahuje PBS a 15mM azid sodný. Obsah fľaštičky (1 ml reagentie) odpovedá uskutočneniu 50 testov.

### 5. Skladovanie

Fľaštičku s reagentiou uschovávajú v temne pri teplote 2-8°C. Doba použiteľnosti reagentie je vyznačená na štítku fľaštičky.

### 6. Upozornenie

- Reagencia je určená pre In vitro diagnostiku a vyhovuje požiadavkám európskej smernice pre In vitro diagnostické zdravotnícke prostriedky 98/79/EC.
- Nepoužívajte reagentiu po uplynutí doby použiteľnosti.
- Reagentiu nevystavujte dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Obsah fľaštičky nesmie zmraznúť.
- Chráňte obsah fľaštičky pred kontamináciou.
- Prietokový cytometer pravidelne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľčiek, pre zaistenie stabilnej citlivosti detektorov.
- Nedodržanie postupu merania môže ovplyvniť výsledky testu.
- Reagencia obsahuje azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ), ktorý je v čistom stave vysoko toxický, avšak koncentrácia prítomná v tejto reagentii (15 mM) už nie je považovaná za nebezpečnú.

Pri likvidácii reagenty obsahujúcej azid splachujte umývadlo veľkým množstvom vody.

- Krvné vzorky sú považované za potenciálne infekčný materiál a preto sa s nimi musí zaobchádzať opatrne. Vyvarujte sa kontaktu vzoriek s pokožkou, očami a sliznicami.

## 7. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý sa nedodáva

Vhodné skúmavky pre značenie buniek (napr. 12 × 75 mm), sada pipiet s jednorázovými špičkami, centrifúga, vortex, lyzačný roztok, PBS tlmivý roztok, prietokový cytometer.

## 8. Vzorky krvi

Vzorku periférnej krvi odobratú do sterilnej skúmavky s antikoagulantom (heparín alebo EDTA) skladujte pred značením pri laboratórnej teplote na kývačke. Krv musí byť značená do 48 hod od odberu.

## 9. Postup značenia

1. Pipetujte 20 µl reagenty KOMBITEST™ CD3 FITC / CD19 PE.
2. Pridajte 100 µl premiešanej periférnej krvi a zmes premiešajte pomocou vortexu.
3. Skúmavku inkubujte 15-20 minút v temne pri laboratórnej teplote.
4. Zlyžujte červené krvinky pomocou lyzačného roztoku. Odporúča sa používať komerčné lyzačné činidlo, ktoré obsahuje formaldehyd a fixuje bunky. Postupujte podľa návodu od výrobcu lyzačného činidla.
5. Centrifugujte skúmavky 5 minút pri 300 g.
6. Odstráňte supernatant a resuspendujte sediment pomocou 3-4 ml PBS.
7. Centrifugujte skúmavky 5 minút pri 300 g.
8. Odstráňte supernatant a resuspendujte sediment pomocou 0,1-0,5 ml PBS.
9. Vzorky analyzujte na prietokovom cytometri ihneď po označení. V prípade, že vzorky boli fixované formaldehydom, je možné tieto vzorky uskladniť v temne pri 2-8°C a analyzovať do 24 hodín.

## 10. Cytometrické meranie

Analyzujte značenú vzorku krvi pomocou prietokového cytometru vybaveného laserom 488 nm a vhodnými filtrami. Kompenzujte namerané dáta fluorescenčných signálov.

## 11. Analýza dát

Kompenzované dáta zobrazte v grafe side-scatter (SSC) proti forward-scatter (FSC). Ohraničte populáciu lymfocytov, ako je to znázornené na obrázku 1. Optimálne ohraničenie lymfocytov je možné alternatívne nastaviť pomocou reagenty KOMBITEST™ CD45 FITC / CD14 PE (doporučený postup nastavenia je uvedený v návode k použitiu). Potom zobrazte ohraničené lymfocyty v grafe CD3 FITC proti CD19 PE. Separujte jednotlivé populácie lymfocytov pomocou vhodne nastavených regiónov, ako je to znázornené na obrázku 2 a spočítajte percentuálne zastúpenie T lymfocytov umiestnených v pravom spodnom kvadrante (CD3+CD19-) a B lymfocytov umiestnených v ľavom hornom kvadrante (CD3-CD19+).

## 12. Očakávané hodnoty

Výsledky počtu pozitívnych buniek môžu kolísať medzi jednotlivými laboratóriami. Každé laboratórium by si malo ustanoviť vlastný rozsah normálnych hodnôt. Dáta namerané v našom laboratóriu sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Subpopulácie lymfocytov	jednotka	n	priemer	95% interval
CD3+CD19-	%	108	71	52-83
	buniek/µl	54	1480	886-2341
CD3-CD19+	%	108	13	5-24
	buniek/µl	54	242	87-445

## 13. Analytické parametre

### Špecifickosť

Monoklonálna protilátka UCHT1 rozpoznáva CD3 antigén TCR/CD3 komplexu na zreloch ľudských T lymfocytoch. Táto protilátka špecificky reaguje s epsilon reťazcom CD3 komplexu. Špecifickosť monoklonálnej protilátky UCHT1 bola overená v rámci medzinárodných pracovných seminárov o ľudských leukocytných diferenciálnych antigénoch (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).

Monoklonová protilátka LT19 reaguje s antigénom CD19 (B4), 95 kDa transmembránovým glykoproteínom typu I imunoglobulinovej rodiny, ktorý je exprimovaný B lymfocytmi a folikulárnymi dendritickými bunkami. Plazmatické bunky CD19 už neexprimujú.

### Presnosť

Presnosť merania bola overená porovnaním produktu KOMBITEST™ s konkurenčným produktom paralelným meraním 43 vzoriek krvi. Výsledky regresnej analýzy v grafickej podobe sú uvedené v anglickej jazykovej verzii tohto návodu (kap. 13).

### Lineárnosť

Lineárnosť merania bola overená pomocou desaťbodovej riediacej rady krvnej vzorky obohatenej o leukocyty (buffy coat). Vzorky riediacej rady boli označené pomocou reagenty KOMBITEST™ v triplikátoch a podrobené analýze. Výsledky testovania lineárnosti merania v grafickej podobe sú uvedené v anglickej jazykovej verzii tohto návodu (kap. 13).

### Opakovateľnosť

Opakovateľnosť merania bola testovaná na stabilizovanej krvnej vzorke (Immuno-Troll™ Cells, Beckman-Coulter), ktorá bola pri rovnakých experimentálnych podmienkach označená a analyzovaná 10x. Koeficienty variácie (CV) pre jednotlivé subpopulácie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Subpopulácie lymfocytov	jednotka	n	priemer	SD	CV
CD3+CD19-	%	10	70,3	0,94	1,34
CD3-CD19+	%	10	14,5	1,36	9,37

## Reprodukovateľnosť

Reprodukovateľnosť merania bola testovaná na stabilizovanej krvnej vzorke (Immuno-Troll™ Cells, Beckman-Coulter) pri rovnakých experimentálnych podmienkach po dobu štyroch týždňov. Koeficienty variácie (CV) pre jednotlivé subpopulácie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Subpopulácie lymfocytov	jednotka	n	priemer	SD	CV
CD3+CD19-	%	14	72,7	0,97	1,34
CD3-CD19+	%	14	13,2	1,16	8,78

## 14. Obmedzenia metódy

- Prietokový cytometer môže poskytovať nepresné výsledky, ak nie je dobre nastavený a udržiavaný.
- Dáta môžu byť zle interpretované, ak sú fluorescenčné signály nedostatočne kompenzované alebo ak sú regióny buniek zle umiestnené.
- Krvné vzorky od abnormálnych pacientov môžu vykazovať abnormálne percentuálne hodnoty pozitívnych buniek.
- V prípade krvnej vzorky s abnormálne vysokým počtom leukocytov je potrebné vzorku nariediť pomocou PBS na hodnotu približne  $5 \times 10^6$  leukocytov na ml.

## 15. Example data / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

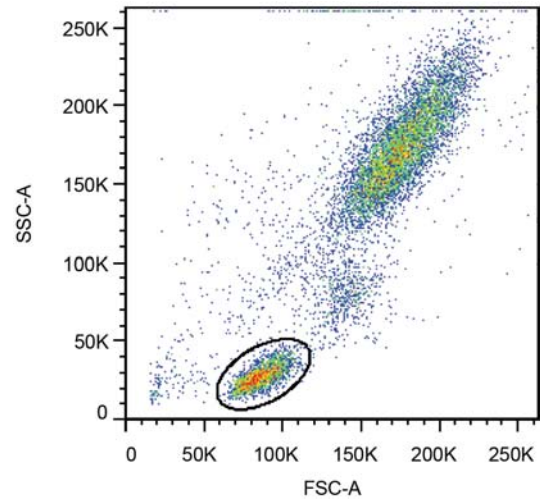


Fig. 1: Delimitation of lymphocyte population

Obr. 1: Ohraničení lymfocytů

Obr. 1: Ohraničenie populácie lymfocytov

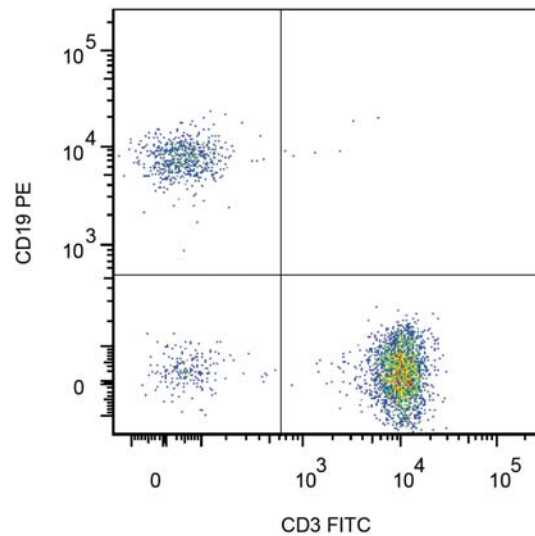


Fig. 2: Lymphocytes in a dot-plot CD19 PE vs. CD3 FITC

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

Obr. 2: Lymfocyty v grafe CD19 PE vs. CD3 FITC

## 16. References / Literatura / Literatúra

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.

## 17. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

	In Vitro Diagnostic Medical Device In vitro diagnostický zdravotnícký prostriedek In vitro diagnostický zdravotnícký prostriedok
	Catalog number Katalógové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
	Consult the manual before use Viz návod k použitiu Viď návod na použitie
	Sufficient for N test Lze použiť pro N testů Postačujúce na vykonanie N testov
	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplôt Rozmedzie skladovacích teplôt
	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do

## 18. Manufacturer / Výrobce / Výrobca

**EXBIO Praha, a.s.**

Nad Safinou II 341

252 42 Vestec, Czech Republic

Tel: +420 261 090 666

Fax: +420 261 090 660

E-mail: [orders@exbio.cz](mailto:orders@exbio.cz)

<http://www.exbio.cz>