

KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC

Cat. No. / Kat. č.: ED7074

ENGLISH

1. Manufacturer

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
www.exbio.cz

2. Specification

Content	50 tests, 1 ml				
Usage	20 µl per test				
Specificity	CD3	CD16	CD56	CD45	CD19
Clone	UCHT1	3G8	LT56	MEM-28	LT19
Isotype (mouse)	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1
Fluorochrome	FITC	PE		PerCP	APC
λ excitation	488 nm	488 nm		488 nm	633 nm
Emission maximum	525 nm	575 nm		670 nm	660 nm

3. Intended use

The KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC is designed for identification and enumeration of human T, natural killer, and B lymphocytes in erythrocyte-lysed whole blood using Flow Cytometry.

4. 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.

5. Reagent provided

The reagent contains a premixed combination of mouse monoclonal antibody against human CD3 antigen (clone UCHT1) labeled with Fluorescein isothiocyanate (FITC), mouse monoclonal antibody against human CD16 antigen (clone 3G8) labeled with R-phycoerythrin (PE), mouse monoclonal antibody against human CD56 antigen (clone LT56) labeled with R-phycoerythrin (PE), mouse monoclonal antibody against human CD45 antigen (clone MEM-28) labeled with Peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP), and mouse monoclonal antibody against human CD19 antigen (clone LT19) labeled with Allophycocyanin (APC). 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.

6. Storage

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

7. Evidence of deterioration

In case of reagent deterioration or if obtained data show any performance alteration, please contact manufacturer using following e-mail address: technical@exbio.cz

8. 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 (NaN₃) 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.

9. Necessary material not supplied

Test tubes for staining of blood samples (e.g. 12 × 75 mm), automatic pipettes with disposable tips, vortex mixer, EXCELLYSE Easy lysing solution (Cat.No. ED7066), flow cytometer with two lasers (488 nm and 633 or 635 nm).

10. 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.

11. Staining protocol

- Add 20 µl of KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC reagent to a test tube.
- Add 50 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 EXCELLYSE Easy lysing solution (Cat.No. ED7066) or any other commercial lysing solution containing formaldehyde as a fixative. Follow the instructions of the lysing solution manufacturer.
- 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.

12. Flow cytometry

Analyze stained samples using a flow cytometer equipped with two excitation lasers (488 nm and 633 or 635 nm) and proper filters. Compensate fluorescent signals prior to or after data acquisition.

13. Data analysis

Visualize compensated data on the side-scatter (SSC) versus CD45 PerCP plot. Set the gate for CD45+ lymphocyte population as shown in figure 1 (chapter 18).

Visualize CD45+ lymphocytes in a dot-plot CD16+56 PE versus CD3 FITC as shown in figure 2 (chapter 18). Separate populations using appropriate gate and calculate the percentage of natural killer (NK) lymphocytes situated in upper-left quadrant (CD3-CD16+56+) on the dot-plot.

Visualize CD45+ lymphocytes in a dot-plot CD19 APC versus CD3 FITC as shown in figure 3 (chapter 18). Separate populations using appropriate gate and calculate the percentage of B lymphocytes situated in upper-left quadrant (CD3-CD19+) and T lymphocytes situated in lower-right quadrant (CD3+CD19-) on the dot-plot.

14. 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+	%	108	71	52-83
	cells/ μ l	54	1480	886-2341
CD16+CD56+	%	108	15	6-34
	cells/ μ l	54	319	121-536
CD19+	%	108	13	5-24
	cells/ μ l	54	242	87-445

15. 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 antibody 3G8 recognizes CD16, a low affinity receptor for aggregated IgG (Fc γ RIII antigen). CD16 exists in two different isoforms: CD16a (Fc γ RIIIA; 50-65 kDa; expressed on NK-cells, monocytes and macrophages) and CD16b (Fc γ RIIIB; 48 kDa; mainly expressed on neutrophils).

HLDA V; WS Code NK80

The antibody LT56 reacts with a 180 kDa isoform of CD56 (NCAM) characteristic for leukocytes. CD56 is a single transmembrane glycoprotein of immunoglobulin supergene family; the molecular weights of different isoforms ranging from 135 to 220 kDa.

The antibody MEM-28 reacts with all alternative forms of human CD45 phosphotyrosine phosphatase (Leukocyte Common Antigen), a 180-220 kDa single chain type I transmembrane protein expressed at high level on all cells of hematopoietic origin, except from erythrocytes and platelets.

HLDA III; WS Code NL 833a

The antibody LT19 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™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC with competitor's product in parallel staining of blood samples. Samples were analyzed using BD FACSCanto™ Flow Cytometer. The regression parameters are given in the table below.

Lymphocyte Subset	Unit	n	Slope	Intercept	r ²	Range
CD3+	%	109	0.985	1.72	0.946	49-87
	cells/ μ l	54	0.999	28.0	0.898	814-2887
CD16+CD56+	%	109	0.957	0.37	0.966	2.5-45
	cells/ μ l	54	1.025	-0.58	0.966	90-1115
CD19+	%	109	0.998	-0.34	0.944	2.4-25
	cells/ μ l	54	0.942	14.0	0.927	58-457

Linearity

The linearity of the method was verified on 10 serial dilutions of leukocyte-enriched blood sample (buffy coat). Cell samples were stained by KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC in triplicates. Measured data were observed to be linear across the tested range 48-24400 lymphocytes/ μ l. Cell subsets were in following ranges.

Lymphocyte Subset	Range (cells/ μ l)
CD3+	36-18178
CD16+CD56+	9-4444
CD19+	3-1530

Repeatability

The repeatability of the assay was measured on one blood sample in twelve tubes in parallel. Coefficients of variation (CV) are given in the table below.

Lymphocyte Subset	Unit	n	Average	SD	CV
CD3+	%	12	71.6	0.95	1.32
	cells/ μ l	12	1986	119	5.97
CD16+CD56+	%	12	16.9	0.80	4.74
	cells/ μ l	12	469	30	6.50
CD19+	%	12	10.8	0.43	3.95
	cells/ μ l	12	298	16	5.34

Reproducibility

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

Lymphocyte Subset	Unit	n	Average	SD	CV
CD3+	%	11	75.0	1.00	1.30
	cells/ μ l	11	899	29.4	3.27
CD16+CD56+	%	11	13.0	0.79	6.08
	cells/ μ l	11	156	12.7	8.16
CD19+	%	11	10.4	0.46	4.38
	cells/ μ l	11	125	8.4	6.73

16. Limitations

- Concentrations of labeled antibodies in this reagent were optimized to offer the best specific signal/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the reagent volume/sample volume ratio in every test.
- 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 5×10^6 leukocytes/ml.

17. Trademarks

KOMBITEST™ is registered trademark of EXBIO Praha, a.s. BD FACSCanto™ is registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

1. Výrobce

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

www.exbio.cz

2. Specifikace produktu

Obsah	50 testů, 1 ml				
Použití	20 µl na test				
Specifická	CD3	CD16	CD56	CD45	CD19
Klon	UCHT1	3G8	LT56	MEM-28	LT19
Izotyp (myši)	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1
Fluorochrom	FITC	PE		PerCP	APC
λ excitace	488 nm	488 nm		488 nm	633 nm
Emisní maximum	525 nm	575 nm		670 nm	660 nm

3. Použití

KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC je reagent určená pro identifikaci a počítání T lymfocytů, NK lymfocytů a B lymfocytů v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie.

4. Princip

Tento test je založen na specifické vazbě monoklonálních protilátek na antigeny, které jsou exprimovány na povrchu leukocytů. Monoklonální protilátky jsou značeny 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.

5. Popis reagentie

Reagentie obsahuje směs pěti myších monoklonálních protilátek: protilátka proti lidskému antigenu CD3 (klon UCHT1) je značená fluorescein isothiokyanátem (FITC), protilátka proti lidskému antigenu CD16 (klon 3G8) je značená R-phycoerythrinem (PE), protilátka proti lidskému antigenu CD56 (klon LT56) je značená R-phycoerythrinem (PE), protilátka proti lidskému antigenu CD45 (klon MEM-28) je značená Peridinin-chlorophyll-protein komplexem (PerCP) a protilátka proti lidskému antigenu CD19 (klon LT19) je značená Allophycocyaninem (APC). 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.

6. Skladování

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

7. Změny kvality produktu

V případě pozorování jakýchkoliv zhoršení vlastností produktu, prosíme, neprodleně informujte výrobce prostřednictvím e-mailové adresy: technical@exbio.cz

8. 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 (NaN₃), 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.

9. 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 EXCELLYSE Easy (Kat. č. ED7066), průtokový cytometr se dvěma excitačními lasery (488 nm a 633 nebo 635 nm).

10. Vzorek krve

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

11. Postup barvení

- Pipetujte 20 µl reagentie KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC do zkumavky.
- Přidejte 50 µl promíchané 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.
- 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.

12. Cytometrické měření

Analýzujte obarvený vzorek pomocí průtokového cytometru vybaveného dvěma excitačními lasery (488 nm a 633 nebo 635 nm) a vhodnými filtry. Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat.

13. Analýza dat

Kompenzovaná data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus CD45 PerCP. Ohraničte populaci CD45+ lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1 (kap. 18).

Poté zobrazte ohraničené CD45+ lymfocyty v grafu CD16+56 PE versus CD3 FITC. Separujte jednotlivé populace lymfocytů pomocí vhodně nastavených regionů, jak je znázorněno na obrázku 2 (kap. 18) a spočítejte procentuelní zastoupení NK lymfocytů umístěných v levém horním kvadrantu (CD3-CD16+56+).

Poté zobrazte ohraničené CD45+ lymfocyty v grafu CD19 APC versus CD3 FITC. Separujte jednotlivé populace lymfocytů pomocí vhodně nastavených regionů, jak je znázorněno na obrázku 3 (kap. 18) a spočítejte procentuelní zastoupení B lymfocytů umístěných v levém horním kvadrantu (CD3-CD19+) a T lymfocytů umístěných v pravém spodním kvadrantu (CD3+CD19-).

14. 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% Range
CD3+	%	108	71	52-83
	cells/μl	54	1480	886-2341
CD16+CD56+	%	108	15	6-34
	cells/μl	54	319	121-536
CD19+	%	108	13	5-24
	cells/μl	54	242	87-445

15. 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 diferenciačních 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 3G8 rozpoznává CD16 antigen (FcγRIII), nízkofinální receptor pro agregovaný imunoglobulin G. CD16 se vyskytuje ve dvou odlišných izoformách: CD16a (FcγRIIIA; 50-65 kDa; exprimována na NK-buňkách, monocytech, makrofázích) a CD16b (FcγRIIIB; 48 kDa; exprimována na neutrofilech). Specifická monoklonální protilátka 3G8 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciačních antigenech:

HLDA V; WS Code NK80

Monoklonální protilátka LT56 reaguje s izoformou proteinu CD56 (NCAM) o molekulové hmotnosti 180 kDa, charakteristickou pro leukocyty. CD56 je jednoduchý transmembránový glykoprotein patřící do imunoglobulinové rodiny.

Monoklonální protilátka MEM-28 reaguje se všemi izoformami molekuly CD45. Fosfotyrosinofosfatasa CD45 (Leucocyte Common Antigen) je jednořetězcový transmembránový protein o molekulové hmotnosti 180-220 kDa, exprimovaný ve velkém množství u všech buněk hematopoetického původu kromě erytrocytů a krevních destiček. Specifická monoklonální protilátka MEM-28 byla ověřena v rámci mezinárodního pracovního semináře o lidských leukocytárních diferenciačních antigenech:

HLDA III; WS Code NL 833a

Monoklonální protilátka LT19 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 produktu KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC

s konkurenčním produktem paralelním měřením vzorků krve. Obarvené vzorky byly analyzovány pomocí BD FACSCanto™ Flow Cytometer. Výsledky regresní analýzy jsou uvedené v následující tabulce.

Subpopulace lymfocytů	jednotka	n	směrnice	intercept	r ²	rozsah
CD3+	%	109	0,985	1,72	0,946	49-87
	cells/μl	54	0,999	28,0	0,898	814-2887
CD16+CD56+	%	109	0,957	0,37	0,966	2,5-45
	cells/μl	54	1,025	-0,58	0,966	90-1115
CD19+	%	109	0,998	-0,34	0,944	2,4-25
	cells/μl	54	0,942	14,0	0,927	58-457

Linearita

Linearita měření byla ověřena pomocí desetibodové ředící řady krevního vzorku obohaceného o leukocyty (buffy coat). Vzorky ředící řady byly obarveny pomocí KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC v triplikátech a analyzovány. Naměřená data byla shledána lineární v celém testovaném rozsahu 48-24400 lymfocytů/μl. Rozsahy sledovaných subpopulací jsou uvedené v následující tabulce.

Subpopulace lymfocytů	rozsah (cells/μl)
CD3+	36-18178
CD16+CD56+	9-4444
CD19+	3-1530

Opakovatelnost

Opakovatelnost měření byla testována na jednom vzorku krve, který byl za stejných experimentálních podmínek obarven a změřen 12x. Koeficienty variance (CV) pro jednotlivé subpopulace jsou uvedené v následující tabulce.

Subpopulace lymfocytů	jednotka	n	průměr	SD	CV
CD3+	%	12	71,6	0,95	1,32
	cells/μl	12	1986	119	5,97
CD16+CD56+	%	12	16,9	0,80	4,74
	cells/μl	12	469	30	6,50
CD19+	%	12	10,8	0,43	3,95
	cells/μl	12	298	16	5,34

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost měření byla testována na stabilizovaném krevním vzorku (Immuno-Troll™ Cells, Beckman-Coulter) za stejných experimentálních podmínek po dobu čtyř týdnů. Koeficienty variance (CV) pro jednotlivé subpopulace jsou uvedené v následující tabulce.

Subpopulace lymfocytů	jednotka	n	průměr	SD	CV
CD3+	%	11	75,0	1,00	1,30
	cells/μl	11	899	29,4	3,27
CD16+CD56+	%	11	13,0	0,79	6,08
	cells/μl	11	156	12,7	8,16
CD19+	%	11	10,4	0,46	4,38
	cells/μl	11	125	8,4	6,73

16. Omezení metody

- Koncentrace značené protilátky v reagentii byla optimalizována s cíle nejlepšího poměru specifického signálu k nespecifickému signálu. Z tohoto důvodu je důležité dodržovat doporučený poměr objemu reagentie a objemu vzorku v každém testu.
- 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 5×10^6 leukocytů na ml.

17. Trademarks

KOMBITEST™ je registrovaná značka společnosti EXBIO Praha, a.s. BD FACSCanto™ je registrovaná značka společnosti Becton, Dickinson and Company.

1. 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

www.exbio.cz

2. Špecifikácia produktu

Obsah	50 testov, 1 ml				
Použitie	20 µl na test				
Špecifickosť	CD3	CD16	CD56	CD45	CD19
Klon	UCHT1	3G8	LT56	MEM-28	LT19
Izotyp (myšie)	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1
Fluorochróm	FITC	PE		PerCP	APC
λ excitácia	488 nm	488 nm		488 nm	633 nm
Emisné maximum	525 nm	575 nm		670 nm	660 nm

3. Použitie

Reagencia KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC je In vitro diagnostický zdravotnícky prostriedok, ktorý je určený na identifikáciu a počítanie T lymfocytov, NK lymfocytov (prirodzených zabíjajúcich buniek) a B lymfocytov v ľudskej periférnej krvi pomocou prietokovej cytometrie.

4. 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 exprese analyzovaných antigénov.

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

5. Popis reagencie

Reagencia obsahuje zmes piatich myších monoklonových protilátok: protilátka proti ľudskému antigénu CD3 (klon UCHT1 je označená fluorescein izotiokyanátom (FITC), protilátka proti ľudskému antigénu CD16 (klon 3G8) je označená R-phycoerythrinom (PE), protilátka proti ľudskému antigénu CD56 (klon LT56) je označená R-phycoerythrinom (PE), protilátka proti ľudskému antigénu CD45 (klon MEM-28) je označená Peridinin-chlorophyll-protein komplexom (PerCP) a protilátka proti ľudskému antigénu CD19 (klon LT19) je označená Allophycocyaninom (APC). Označené protilátky boli nariadené na optimálnu koncentráciu do stabilizačného roztoku, ktorý obsahuje PBS a 15mM azid sodný. Obsah fľaštičky (1 ml reagencie) odpovedá uskutočneniu 50 testov.

6. Skladovanie

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

7. Zmeny kvality produktu

V prípade spozorovania akýchkoľvek zhoršení vlastností produktu, prosíme, ihneď informujte výrobcu prostredníctvom e-mailovej adresy: technical@exbio.cz

8. 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 zmŕznúť.
- 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 (NaN₃), ktorý je v čistom stave vysoko toxický, avšak koncentrácia prítomná v tejto reagentii (15 mM) už nie je považovaná za nebezpečnú. Pri likvidácii reagencie 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.

9. 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 EXCELLYSE Easy (Kat. č. ED7066), prietokový cytometer s dvomi excitujúcimi lasermi (488 nm a 633 alebo 635 nm).

10. 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.

11. Postup značenia

- Pipetujte 20 µl reagencie KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC do skúmavky.
- Pridajte 50 µl premiešanej periférnej krvi a zmes premiešajte pomocou vortexu.
- Skúmavku inkubujte 15-20 minút v temne pri laboratórnej teplote.
- Zlyžujte červené krvinky pomocou lyzačného roztoku EXCELLYSE Easy (Kat. č. ED7066) alebo iného komečného lyzačného roztoku, ktorý obsahuje formaldehyd a fixuje bunky. Postupujte podľa návodu od výrobcu lyzačného roztoku.
- 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.

12. Cytometrické meranie

Analyzujte značenú vzorku krvi pomocou prietokového cytometru vybaveného dvomi excitujúcimi lasermi (488 nm a 633 alebo 635 nm) a vhodnými filtrami. Kompenzujte namerané dáta fluorescenčných signálov.

13. Analýza dát

Kompenzované dáta zobrazte v grafe side-scatter (SSC) versus CD45 PerCP. Ohraničte populáciu CD45+ lymfocytov, ako je to znázornené na obrázku 1 (kap. 18). Potom zobrazte ohraničené CD45+ lymfocyty v grafe CD16+56 PE versus CD3 FITC. Separujte jednotlivé populácie lymfocytov pomocou vhodne nastavených regiónov, ako je to znázornené na obrázku 2 (kap. 18) a spočítajte percentuálne zastúpenie NK lymfocytov umiestnených v ľavom hornom kvadrante (CD3-CD16+56+). Potom zobrazte ohraničené CD45+ lymfocyty v grafe CD19 APC versus CD3 FITC. Separujte jednotlivé populácie lymfocytov pomocou vhodne nastavených regiónov, ako je to znázornené na obrázku 3 (kap. 18) a spočítajte percentuálne zastúpenie B lymfocytov umiestnených v ľavom hornom kvadrante (CD3-CD19+) a T lymfocytov umiestnených v pravom spodnom kvadrante (CD3+CD19-).

14. 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% Range
CD3+	%	108	71	52-83
	cells/μl	54	1480	886-2341
CD16+CD56+	%	108	15	6-34
	cells/μl	54	319	121-536
CD19+	%	108	13	5-24
	cells/μl	54	242	87-445

15. Analytické parametre

Špecifickosť

Monoklonová protilátka UCHT1 rozpoznáva CD3 antigén TCR/CD3 komplexu na zreľých ľudských T lymfocytoch. Táto protilátka špecificky reaguje s epsilon reťazcom CD3 komplexu. Špecifickosť monoklonovej protilátky UCHT1 bola overená v rámci medzinárodných pracovných seminárov o ľudských leukocytárných 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 3G8 rozpoznáva CD16 antigén (FcγRIII), nízkoafinitný receptor pre agregovaný imunoglobulín G. CD16 sa vyskytuje v dvoch odlišných izoformách: CD16a (FcγRIIIA; 50-65 kDa; exprimovaná na NK-bunkách, monocytoch, makrofágoch) a CD16b (FcγRIIIB; 48 kDa; exprimovaná na neutrofiloch). Špecifickosť monoklonovej protilátky 3G8 bola overená v rámci medzinárodného pracovného seminára o ľudských leukocytárných diferenciálnych antigénoch (HLDA V; WS Code NK80).

Monoklonová protilátka LT56 reaguje s izoformou proteínu CD56 (NCAM) s molekulovou hmotnosťou 180 kDa, charakteristickou pre leukocyty. CD56 je jednoduchý transmembránový glykoproteín patriaci do rodiny imunoglobulínov.

Monoklonová protilátka MEM-28 reaguje so všetkými izoformami molekuly CD45. Fosfotyrozínofosfatáza CD45 (Leucocyte Common Antigen) je jednoreťazcový transmembránový proteín s molekulovou hmotnosťou 180-220 kDa, exprimovaný vo veľkom množstve u všetkých buniek hematopoetického pôvodu, okrem erytrocytov a krvných doštičiek. Špecifickosť monoklonovej protilátky MEM-28 bola overená v rámci medzinárodného pracovného seminára o ľudských leukocytárných diferenciálnych antigénoch (HLDA3 WS Code: NL 833a).

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

Presnosť

Presnosť merania bola overená porovnaním produktu KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC s konkurenčným produktom paralelným meraním vzoriek krvi. Označené vzorky boli analyzované pomocou BD FACSCanto™ Flow Cytometer. Výsledky regresnej analýzy sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Subpopulácie lymfocytov	jednotka	n	smernice	intercept	r ²	rozsah
CD3+	%	109	0,985	1,72	0,946	49-87
	cells/μl	54	0,999	28,0	0,898	814-2887
CD16+CD56+	%	109	0,957	0,37	0,966	2,5-45
	cells/μl	54	1,025	-0,58	0,966	90-1115
CD19+	%	109	0,998	-0,34	0,944	2,4-25
	cells/μl	54	0,942	14,0	0,927	58-457

Lineárnosť

Lineárnosť merania bola overená pomocou desaťbodovej riediacej rady krvnej vzorky obohatenej o leukocyty (buffy coat). Vzorky riediacej rady boli označené pomocou KOMBITEST™ CD3 FITC / CD16+CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC v triplikátoch a podrobené analýze. Namerané dáta boli uznané ako lineárne v celom testovanom rozsahu 48-24400 lymfocytov/μl. Rozsahy sledovaných subpopulácií sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Subpopulácie lymfocytov	rozsah (cells/μl)
CD3+	36-18178
CD16+CD56+	9-4444
CD19+	3-1530

Opakovateľnosť

Opakovateľnosť merania bola testovaná na jednej vzorke krvi, ktorá bola pri rovnakých experimentálnych podmienkach označená a analyzovaná 12x. Koeficienty variácie (CV) pre jednotlivé subpopulácie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Subpopulácie lymfocytov	jednotka	n	priemer	SD	CV
CD3+	%	12	71,6	0,95	1,32
	cells/μl	12	1986	119	5,97
CD16+CD56+	%	12	16,9	0,80	4,74
	cells/μl	12	469	30	6,50
CD19+	%	12	10,8	0,43	3,95
	cells/μl	12	298	16	5,34

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+	%	11	75,0	1,00	1,30
	cells/μl	11	899	29,4	3,27
CD16+CD56+	%	11	13,0	0,79	6,08
	cells/μl	11	156	12,7	8,16
CD19+	%	11	10,4	0,46	4,38
	cells/μl	11	125	8,4	6,73

16. Obmedzenia metódy

- Koncentrácia značenej protilátky v reagentii bola optimalizovaná s cieľom najlepšieho pomeru špecifického signálu k nešpecifickému signálu. Z tohto dôvodu je dôležité dodržiavať odporúčaný pomer objemu reagentie a objemu vzorky v každom teste.
- 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 5×10^6 leukocytov na ml.

17. Trademarks

KOMBITEST™ je registrovaná značka spoločnosti EXBIO Praha, a.s. BD FACSCanto™ je registrovaná značka spoločnosti Becton, Dickinson and Company.

18. Example data / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

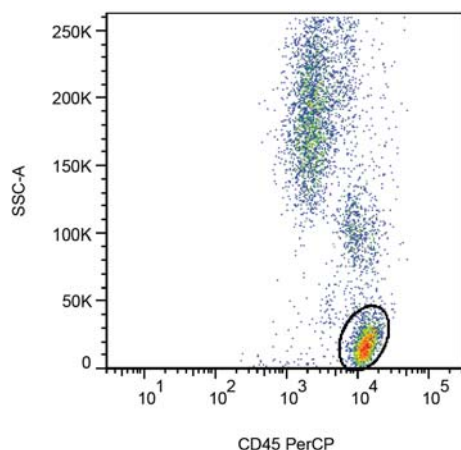


Fig. 1: Delimitation of CD45+ lymphocyte population
Obr. 1: Ohraničení populace CD45+ lymfocytů
Obr. 1: Ohraničenie populácie CD45+ lymfocytov

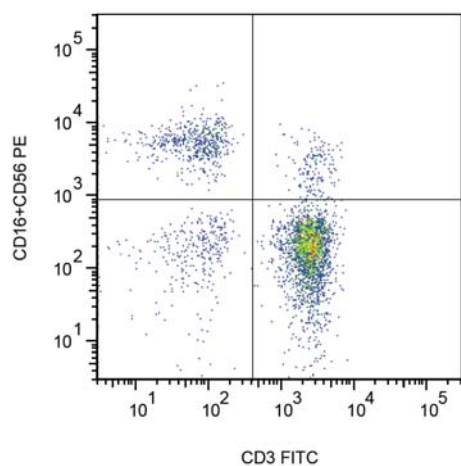


Fig. 2: CD45+ lymphocytes in a dot-plot CD16+CD56 PE vs. CD3 FITC
Obr. 2: CD45+ lymfocyty v grafu CD16+CD56 PE vs. CD3 FITC
Obr. 2: CD45+ lymfocyty v grafe CD16+CD56 PE vs. CD3 FITC

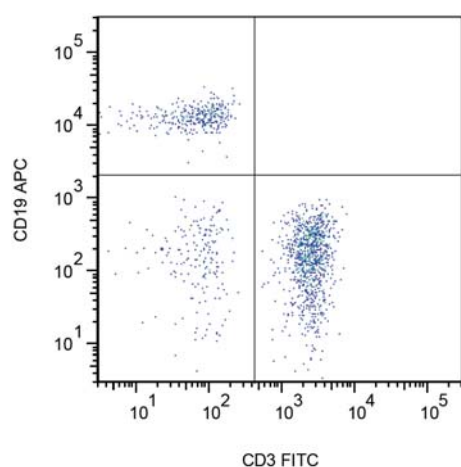


Fig. 3: CD45+ lymphocytes in a dot-plot CD19 APC vs. CD3 FITC
Obr. 3: CD45+ lymfocyty v grafu CD19 APC vs. CD3 FITC
Obr. 3: CD45+ lymfocyty v grafe CD19 APC vs. CD3 FITC

19. References / Literatura / Literatúra

This product has not been published yet.

20. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device In vitro diagnostický zdravotnický prostředek In vitro diagnostický zdravotnícky prostriedok
REF	Catalog number Katalogové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
	Consult the manual before use Viz návod k použití Vid' návod na použitie
	Sufficient for N test Lze použít pro N testů Postačujúce na vykonanie N testov
	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplot Rozmedzie skladovacích teplôt
LOT	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do