



# Fox-Flow Hexatest TBNK

## Návod k použití

**REF** 3FF06-50

50 testů



### 1. Účel použití

Produkt Fox-Flow Hexatest TBNK je určen pro spolehlivou identifikaci populací lidských T-lymfocytů (CD3+), včetně pomocných/ indukovaných T-lymfocytů (CD3+CD4+) a supresorových/cytotoxických T-lymfocytů (CD3+CD8+), B-lymfocytů (CD19+), a NK lymfocytů (CD3-CD16+ a/nebo CD56+) v lidské periferní krvi pomocí průtokové cytometrie.

### 2. Princip testu/metody

Test je založen na specifické vazbě fluorescenčně značených monoklonálních protilátek na povrchové antigeny leukocytů. Po přidání testovaného vzorku do činidla se fluorescenčně značená protilátka v činidle specificky naváže na povrchový antigen cílových buněk. Vzorek je dále lyzován (pro odstranění erytrocytů). Protilátky jsou označeny různými fluorescenčními značkami, které jsou během analýzy v průtokovém cytometru excitovány laserem vhodné vlnové délky, což vede k charakteristické fluorescenční emisi. Tyto fluorescenční signály detekované přístrojem poskytují informace o velikosti buněk, jejich vnitřní složitosti a intenzitě exprese příslušného antigenu.

### 3. Složení soupravy

Vialka obsahuje 1 ml roztoku směsi fluorescenčně značených monoklonálních myších protilátek proti lidským antigenům. Použité protilátky mají následující charakteristiky:

- CD3: FITC (488/525 nm),
- CD4: PE-Cy™7 (488/785 nm),
- CD8: APC-Cy™7 (633/785 nm),
- CD16: PE (488/575 nm),
- CD19: APC (633/660 nm),
- CD56: PE (488/575 nm),
- CD45: PerCP-Cy™5.5 (488/695 nm).

Obsah vialky (1 ml) vystačí na 50 testů. Protilátky jsou v 100mM PBS o pH 7,2 přítomny v optimální koncentraci a jsou stabilizovány BSA (0,2 %) a ProClin 300 (1%).

Neposkytovaný (nutný) materiál:

- a) lyzační roztok pro lyzu erytrocytů
- b) sterilní odběrové zkumavky na krev s antikoagulantem (např. EDTA)
- c) automatické pipety (20 µl, 100 µl, 1000 µl) s jednorázovými špičkami

### I.T.A. - Intertact s.r.o.

Provozovna  
Černokostelecká 616/143  
Praha 10 108 00  
Czech Republic

Sídlo  
Pařížská 67/11  
Praha 1 110 00  
Czech Republic

- d) vhodné cytometrické zkumavky (12×75 mm)
- e) vortex
- f) průtokový cytometr

### 4. Skladovací podmínky

Skladujte 18 měsíců mimo dosah slunečního záření při teplotě 2–8 °C. Reagencii nezmrazujte. Produkt spotřebujte do 12 měsíců od otevření.

Číslo šarže a expirace jsou vyznačeny na obalu.

### 5. Požadavky na vzorek

- a) Vzorky plné žilní krve (min. 200 µl) odebírejte do zkumavky s antikoagulantem (např. EDTA) a uchovávejte při laboratorní teplotě.
- b) Vzorek skladujte při laboratorní teplotě, netřeptejte s ním a analyzujte jej do 24 hodin po odběru.
- c) Po obarvení skladujte vzorky ve tmě při teplotě 2–8 °C. Pro odstranění erytrocytů použijte lyzační roztok.
- d) Vzorky s mikrobiální kontaminací, lipidmi, koagulací a špatnou životaschopností buněk by se neměly analyzovat, pokud není vzorek nenahraditelný (informaci vyznačte ve výsledkové zprávě).
- e) Pipetované množství reagentie je 20 µl/10<sup>6</sup> buněk nebo 20 µl/50 µl plné krve. V případě, že reagentie je používána u jiných metod, stanovte si optimální množství.

### 6. Pracovní postup

#### Příprava vzorku:

- a) Pipetujte 20 µl reagentie Fox-Flow Hexatest TBNK do (cytometrické) zkumavky.
- b) Přidejte 50 µl dobře promíchané plné krve ošetřené antikoagulantem (ideálně technikou reverzního pipetování).
- c) Zkumavku uzavřete a jemně promíchejte na vortexu (cca 5 s). Nechte reagovat při laboratorní teplotě po dobu 15–25 min. ve tmě.
- d) Do cytometrické zkumavky pipetujte 450 µl lyzačního roztoku.  
*Pozn.: Různé komerčně dodávané lyzační roztoky mají různé požadavky. Postupujte podle pokynů výrobce daného lyzačního roztoku.*
- e) Zkumavku uzavřete, jemně promíchejte na vortexu (cca 10 s) a inkubujte 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.
- f) Analyzujte vzorek na průtokovém cytometru.

IČO 65408781  
Tel. +420 224 810 196  
Fax +420 222 314 055  
ita@ita-intertact.com

verze: 1  
datum schválení: 25.4.2022  
datum revize: -  
www.ita-intertact.com



## Fox-Flow Hexatest TBNK

### Návod k použití

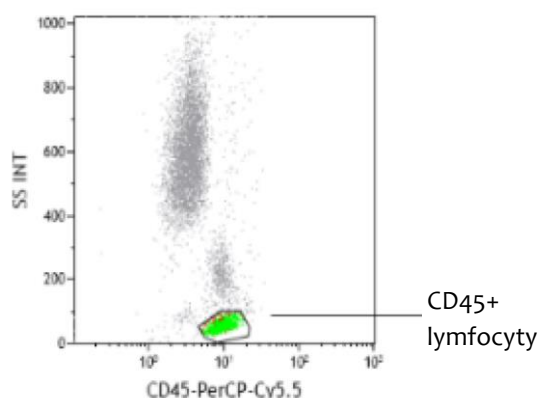


#### Interpretace cytometrické analýzy:

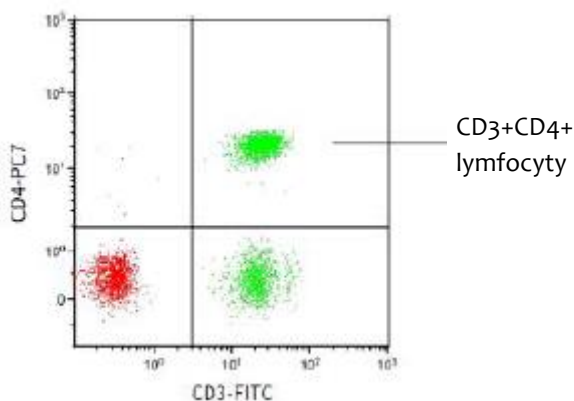
- Připravený vzorek je analyzován na průtokovém cytometru a výsledek analýzy je vyjádřen jako procento cílových buněk vůči leukocytům.
- Pro výběr populace leukocytů k analýze je použito značení protilátkou CD45. Výsledky analýzy lze zpracovat buď (i) automaticky pomocí softwaru nebo (ii) manuálně.

Níže je uveden příklad analýzy a interpretace dat s použitím normálních vzorků periferní krve odebrané dospělému jedinci.

Nejprve data zobrazte v grafu, kde vyneste CD45+ buňky proti side-scatter (SSC). Populace lymfocytů vykazuje vysokou expresi antigenu CD45 a nízkou hodnotu SSC; populace je označena v nepravidelném regionu (Obr. 1, zelená barva). Monocyty vykazují střední míru exprese antigenu CD45, podobně jako hodnoty SSC; a neutrofilové exprimují CD45 v malé míře s vysokými hodnotami SSC. Tyto tři skupiny buněk tvoří dobře rozlišitelné regiony (Obr. 1).



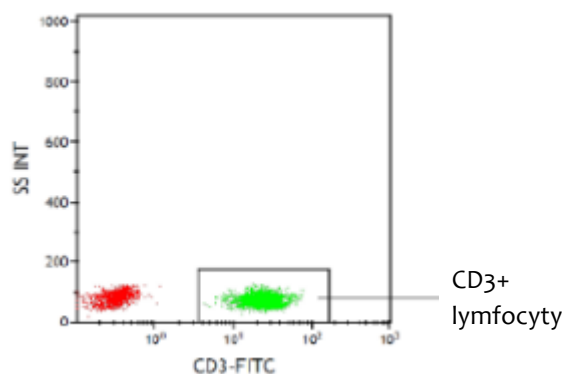
Obr. 1: Označení regionu populace lymfocytů v grafu CD45 vs. SSC.



Obr. 3: Nastavení kvadrantů v grafu CD3 vs. CD4.

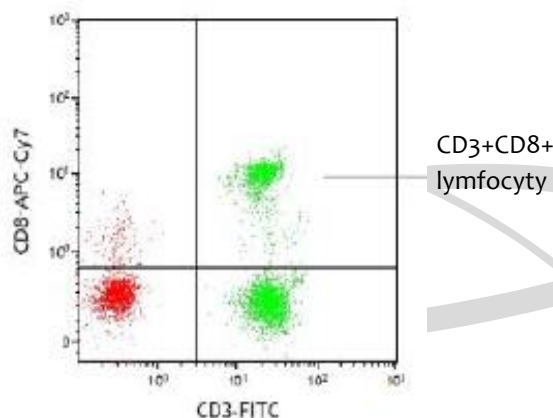
Dále byly vybrány regiony lymfocytárních buněk, které jsou zobrazeny v grafech CD3 vs. SSC (Obr. 2), CD3 vs. CD4 (Obr. 3), CD3 vs. CD8 (Obr. 4), CD3 vs. CD16+56 (Obr. 5) a CD3 vs. CD19 (Obr. 6).

V grafu CD3 vs. SSC jsou jasně odlišeny negativní a pozitivní populace buněk a jsou nastaveny regiony, které označují pozitivní populaci buněk exprimující tento antigen. Procento lymfocytů odpovídající populaci CD3+ buněk je výsledkem relativního počtu CD3+ buněk (Obr. 2).



Obr. 2: Označení populace CD3+ T-lymfocytů v grafu CD3 vs. SSC.

V grafech CD3 vs. CD4, CD3 vs. CD8, CD3 vs. CD16+56 a CD3 vs. CD19 jsou jasně rozlišeny negativní a pozitivní populace buněk, čímž se grafy rozdělily do čtyř kvadrantů. Procento lymfocytů odpovídající pozitivní populaci buněk je výsledkem relativního počtu těchto buněk (Obr. 3-6).



Obr. 4: Nastavení kvadrantů v grafu CD3 vs. CD8.

#### I.T.A. - Intertact s.r.o.

Provozovna  
Černokostecká 616/143  
Praha 10 108 00  
Czech Republic

Sídlo  
Pařížská 67/11  
Praha 1 110 00  
Czech Republic

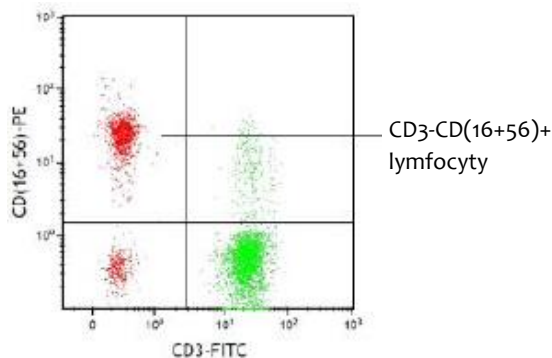
IČO 65408781  
Tel. +420 224 810 196  
Fax +420 222 314 055  
ita@ita-intertact.com

verze: 1  
datum schválení: 25.4.2022  
datum revize: -  
www.ita-intertact.com

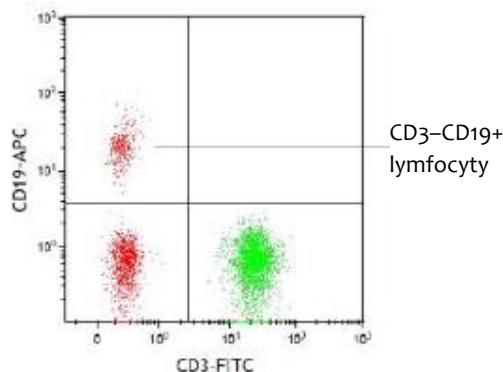


## Fox-Flow Hexatest TBNK

### Návod k použití



Obr. 5: Nastavení kvadrantů v grafu CD3 vs. CD16+56.



Obr. 6: Nastavení kvadrantů v grafu CD3 vs. CD19.

### 7. Referenční interval

Pro hodnocení bylo vybráno celkem 120 zdravých jedinců s normálním krevním obrazem a výsledky s 95% intervalem spolehlivosti byly počítány jako referenční interval.

Parametr	Procentuální obsah (% lymfocytů)
celkový počet T-lymfocytů (CD3+)	61,28–80,87 %
pomocné/indukované T-lymfocyty (CD3+/CD4+)	26,38–50,29 %
supresorové/cytotoxické T-lymfocyty (CD3+/CD8+)	19,24–39,34 %
NK lymfocyty (CD3–/CD16+ nebo CD56+)	5,99–25,62 %
celkové B-lymfocyty (CD19+)	6,74–18,91 %

### 8. Omezení testu

- Tento výrobek se používá pouze pro diagnostiku *in vitro* a výsledky testu slouží pouze pro klinické účely. Klinická diagnóza a léčba pacientů by měla být stanovena na základě jejich symptomů, anamnézy, dalšími laboratorními testy a reakcí na léčbu.
- Pokud není průtokový cytometr kalibrován nebo pokud je kompenzace fluorescence nedostatečná a poloha vybraného regionu (*circle gate*) nesprávná, mohou být získané výsledky nesprávné.
- Pro dosažení optimálního poměru signálu a šumu byly protilátky kalibrovány a reagentie by se měla používat striktně v souladu s udaným poměrem činidla/vzorek.
- Údaje naměřené tímto produktem nejsou přímo srovnatelné s podobnými údaji získanými jinými činidly nebo přístroji.
- Interpretace výsledků může být ovlivněna dalšími faktory, např. různorodou expresí sledovaných antigenů na odlišných buněčných populacích.

### 9. Vlastnosti a analytické parametry

#### a) Přesnost

Hodnocení přesnosti bylo provedeno s použitím buněčného referenčního produktu a málobuněčného referenčního produktu. Pro testování byly zvoleny 3 různé šarže těchto produktů a byly stanoveny hodnoty variačních koeficientů (míry pozitivity) a prům. intenzity fluorescence.

parametry	Buněčný referenční produkt	
	míra pozitivity (%)	prům. intenzita fluorescence
CD3+	1,88	3,13
CD3+CD4+	2,79	3,27
CD3+CD8+	4,93	3,74
CD3-CD19+	5,73	3,50
CD3-CD(16+56)+	6,76	4,27

parametry	Málobuněčný referenční produkt	
	míra pozitivity (%)	prům. intenzita fluorescence
CD3+	2,35	2,57
CD3+CD4+	5,71	3,68
CD3+CD8+	3,33	3,09
CD3-CD19+	5,43	3,67
CD3-CD(16+56)+	4,44	3,42

#### I.T.A. - Intertact s.r.o.

Provozovna  
Černokostecká 616/143  
Praha 10 108 00  
Czech Republic

Sídlo  
Pařížská 67/11  
Praha 1 110 00  
Czech Republic

IČO 65408781  
Tel. +420 224 810 196  
Fax +420 222 314 055  
ita@ita-intertact.com

verze: 1  
datum schválení: 25.4.2022  
datum revize: -  
www.ita-intertact.com



## Fox-Flow Hexatest TBNK

### Návod k použití



#### b) Linearita

Stanovení linearity bylo provedeno pro celkem 5 koncentrací buněčného referenčního produktu a sériově řaděných kontrol. Buněčný referenční produkt byl sériově řaděn v násobcích, aby vzniklo celkem pět koncentrací vzorků, a každá koncentrace byla čtyřikrát opakována. Absolutní nebo relativní hodnota (%) maximálního rozdílu mezi mediánem každé koncentrace a mediánem všech řaděných byla vypočtena jako index pro hodnocení linearity.

subpopulace	Linearita	
	absolutní	relativní [%]
CD3+	2,75	3,77
CD3+CD4+	2,33	4,80
CD3+CD8+	1,33	6,10
CD3-CD19+	0,95	6,82
CD3-CD(16+56)+	0,84	7,59

#### c) Specifita

Bylo prokázáno, že monoklonální protilátky CD3/CD16+56/CD45/CD4/CD19/CD8 přítomné v tomto činidle specificky vážou cílové antigeny. Protilátka CD8 reaguje s CD3- a CD3+ lymfocyty, ale ne s granulocyty a monocyty; protilátka CD16+56 reaguje v různé míře na NK lymfocyty, CD3+ lymfocyty, monocyty a granulocyty, přičemž více než 98 % granulocytů exprimuje antigeny CD16 a/nebo CD56; protilátka CD19 reaguje pouze s CD3- lymfocyty, bez významné zkřížené reaktivity s jinými buňkami.

#### 10. Varování

##### 11. Vysvětlení symbolů

	katalogové číslo
	číslo šarže
	expirace produktu
	omezení teploty
	chránit před slunečním zářením

	diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	CE certifikace
	čtěte návod k použití
	výrobce

#### 12. Výrobce

I.T.A.-Intertact s.r.o.  
Pařížská 67/11  
110 00 Praha 1  
Czech Republic  
[www.ita-intertact.com](http://www.ita-intertact.com)  
[ita@ita-intertact.com](mailto:ita@ita-intertact.com)

QR kód

#### 13. Ochranné známky

Cy™ and CyDye™ jsou registrované značky společnosti Cytiva.

#### 14. Historie revizí

-

#### I.T.A. - Intertact s.r.o.

Provozovna  
Černokostecká 616/143  
Praha 10 108 00  
Czech Republic

Sídlo  
Pařížská 67/11  
Praha 1 110 00  
Czech Republic

IČO 65408781  
Tel. +420 224 810 196  
Fax +420 222 314 055  
[ita@ita-intertact.com](mailto:ita@ita-intertact.com)

verze: 1  
datum schválení: 25.4.2022  
datum revize: -  
[www.ita-intertact.com](http://www.ita-intertact.com)