

KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control

Cat. No. / Kat. č.: ED7032

ENGLISH

1. Specification

Content	50 tests, 1 ml	
Usage	20 µl per test	
Specificity	Undefined epitope on a plant pathogen	
Clone	PPV-04	PPV-04
Isotype (mouse)	IgG2a	IgG2a
Fluorochrome	FITC	PE
λ excitation	488 nm	488 nm
Emission maximum	525 nm	575 nm

2. Intended use

The KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control is designed for setting a boundary between negatively and positively stained lymphocytes when peripheral blood samples are analyzed using two-color (FITC/PE) KOMBITEST™ reagents.

3. Principle

Besides the specific binding of murine antibodies to the antigens, antibodies may also bind to human leukocytes through non-antigen (non-specific) means. This nonspecific binding of monoclonal antibodies may significantly aggravate the resolution between positive and negative fluorescent populations. By showing murine antibodies binding to human leukocytes through non-antigen (non-specific) means, the control sample enables establishing a boundary between negatively and positively stained leukocytes.

4. Specificity

The monoclonal antibody PPV-04 reacts with undefined epitope on a plant pathogen. The antigen is not present on human leukocytes. When added to human whole blood, the antibody PPV-04 does not bind specifically to antigens on the surface of human leukocytes.

5. Reagent provided

The reagent contains premixed combination of mouse monoclonal antibody PPV-04 labeled with Fluorescein isothiocyanate (FITC), and mouse monoclonal antibody PPV-04 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.

6. Storage

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

7. 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.
- Stain the control sample under the same experimental conditions as the test sample. Use the same blood specimen.
- 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.
- Any non-performance of 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 large volume of water to avoid accumulation of explosive metal-azide in plumbing.
- 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.

8. Necessary material not supplied

Material necessary for collection of peripheral blood, test tubes for staining of blood samples (e.g. 12 × 75 mm), automatic pipettes with disposable tips, vortex mixer, centrifuge, commercial lysing solution, phosphate buffered saline (PBS), flow cytometer.

9. Staining protocol

- Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
- Add 20 µl of KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control to a control tube.
- Add 100 µl of blood sample to the tube. Vortex the tube.

4. Incubate the tube for 20-30 minutes at room temperature in the dark.
5. 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.
6. Centrifuge the tube for 5 minutes at 300 g.
7. Remove supernatant and resuspend pellet with 3-4 ml of PBS.
8. Centrifuge the tube for 5 minutes at 300 g.
9. Remove supernatant and resuspend pellet with 0.3 – 0.5 ml of PBS.
10. 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. Data analysis

Analyze the control sample stained with KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control using a flow cytometer. Compensate fluorescent signals prior to or after data acquisition. Visualize compensated data in the side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) plot. Set the gate for lymphocyte population as shown in figure 1. Visualize lymphocytes in a dot-plot PE (FL2) versus FITC (FL1) as shown in figure 2. Set the gate corresponding to the negative population.

11. 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.
- Red blood cells from abnormal patients may be resistant to lysis using lysing solutions.
- In case of hyperleukocytose sample, it is recommended to dilute blood sample with PBS to obtain leukocyte density approximately 5×10^6 leukocytes/ml.
- Blood samples should be stained and analyzed within 24 hours from the blood collection.

ČESKY

1. Specifikace produktu

Obsah	50 testů, 1 ml	
Použití	20 µl na test	
Specifická	Nedefinovaný epitop rostlinného patogenu	
Klon	PPV-04	PPV-04
Izotyp (myši)	IgG2a	IgG2a
Fluorochrom	FITC	PE
λ excitace	488 nm	488 nm
Emisní maximum	525 nm	575 nm

2. Použití

KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control je reagensie určená pro nastavení hranice mezi pozitivně a negativně značenými lymfocyty v rámci analýz krevních vzorků pomocí dvoubarevných (FITC/PE) KOMBITEST™ reagentií.

3. Princip

Kromě specifické vazby myších protilátek na cílové antigeny se mohou protilátky vázat na leukocyty pomocí různých nespecifických vazeb. Tyto nespecifické vazby mohou významně zhoršit rozlišení mezi pozitivně a negativně fluorescenčně značenými populacemi buněk. Kontrolní vzorek, který je obarven myšími protilátkami, které se mohou vázat na leukocyty pouze pomocí nespecifických vazeb, umožňuje nastavit optimální hranici mezi pozitivně a negativně fluorescenčně značenými populacemi.

4. Specifická

Monoklonální protilátka PPV-04 reaguje s nedefinovaným epitopem rostlinného patogenu. Tento antigen není přítomen na lidských leukocytech. Protilátka PPV-04 se může vázat na antigeny lidských leukocytů pouze pomocí nespecifických vazeb.

5. Popis reagentie

Reagensie obsahuje směs myší monoklonální protilátky PPV-04 značené fluorescein isothiokyanátem (FITC) a značené 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.

6. Skladování

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

7. Upozornění

- Reagencie 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.
- Značení kontrolního a testovacího vzorku je třeba provést za stejných experimentálních podmínek. Vzorek krve musí být od jednoho pacienta.
- Nepoužívejte reagencii po uplynutí doby použitelnosti.
- Reagencii nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Obsah vialky nesmí zmraznout.
- Chraňte obsah vialky před kontaminací.
- Nedodržení postupu měření může ovlivnit výsledky testu.
- Reagencie obsahuje azid sodný (NaN_3), který je v čistém stavu vysoce toxický, avšak koncentrace, která je v této reagencii (15 mM), není již považována za nebezpečnou. Při likvidaci reagencie 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.

8. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

Nezbytný materiál pro odběr periferní krve, vhodné zkumavky pro barvení buněk (např. 12 x 75 mm), sada pipet s jednorázovými špičkami, centrifuga, vortex, lyzační roztok, pufr PBS, průtokový cytometr.

9. Postup barvení

- Odeberte periferní krev do sterilní odběrové zkumavky obsahující antikoagulant (např. Heparin, EDTA).
- Pipetujte 20 μl reagencie KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control do kontrolní zkumavky.
- Přidejte 100 μl promíchané periferní krve a směs promíchejte pomocí vortexu.
- Inkubujte zkumavku 20-30 minut v temnu za laboratorní teploty.
- Proveďte lyzi červených krvinek pomocí lyzačního roztoku. Je doporučeno používat komerční lyzační činidlo, které obsahuje formaldehyd fixující buňky. Postupujte podle návodu výrobce lyzačního činidla.
- Centrifugujte zkumavku 5 minut při 300 g.
- Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 3-4 ml PBS.
- Centrifugujte zkumavku 5 minut při 300 g.
- Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 0,3-0,5 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.

10. Analýza dat

Vzorek obarvený pomocí reagencie KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control analyzujte průtokovým cytometrem. Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat. Data poté zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-

scatter (FSC). Ohraničte populaci lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1. Poté zobrazte ohraničené lymfocyty v grafu PE (FL2) versus FITC (FL1), jak je znázorněno na obrázku 2 a nastavte region (gate) odpovídající negativně fluorescenčně značené populaci lymfocytů.

11. 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.
- Červené krvinky některých abnormálních pacientů mohou být rezistentní k lyzi pomocí lyzačních roztoků.
- V případě krevního vzorku s abnormálně vysokým počtem leukocytů je třeba vzorek naředít pomocí PBS na hodnotu kolem 5×10^6 leukocytů na ml.
- Krevní vzorky by neměly být skladovány déle než 24 hodin před barvením.

SLOVENSKY

1. Špecifikácia produktu

Obsah	50 testov, 1 ml	
Použitie	20 μl na test	
Špecifickosť	Nedefinovaný epitop rastlinného patogénu	
Klon	PPV-04	PPV-04
Izotyp (myši)	IgG2a	IgG2a
Fluorochróm	FITC	PE
λ excitácia	488 nm	488 nm
Emisné maximum	525 nm	575 nm

2. Použitie

KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control je reagent určená pre nastavenie hranice medzi pozitívne a negatívne označenými lymfocytmi v rámci analýz krvných vzoriek pomocou dvojfarebných (FITC/PE) KOMBITEST™ reagentii.

3. Princíp

Okrem špecifických väzieb myších protilátok proti cieľovým antigénom, sa môžu protilátky viazať na leukocyty pomocou rôznych nešpecifických väzieb. Tieto nešpecifické väzby môžu významne zhoršiť rozlíšenie medzi pozitívne a negatívne fluorescenčne označenými populáciami buniek. Kontrolná vzorka, ktorá je označená myšími protilátkami, ktoré sa môžu viazať na leukocyty iba pomocou nešpecifických väzieb, umožňuje nastaviť optimálnu hranicu medzi pozitívne a negatívne fluorescenčne označenými populáciami.

4. Špecifickosť

Monoklonová protilátka PPV-04 reaguje s nedefinovaným epitomom rastlinného patogénu. Tento antigén nie je prítomný na Ľudských leukocytoch. Protilátka PPV-04 sa teda môže viazať

na antigény ľudských leukocytov iba pomocou nešpecifických väzieb.

5. Popis reagentie

Reagencia obsahuje zmes myšej monoklonovej protilátky PPV-04 označenej fluorescein izothiokyanátom (FITC) a označenej 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.

6. Skladovanie

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

7. Upozornenie

- Reagencia je určená pre In vitro diagnostiku a vyhovuje požiadavkám európskej smernice pre In vitro diagnostické zdravotnícke prostriedky 98/79/EC.
- Značenie kontrolnej a testovacej vzorky je potrebné vykonať pri rovnakých experimentálnych podmienkach. Vzorka krvi musí byť od jedného pacienta.
- Nepoužívajte reagentiu po uplynutí doby použiteľnosti.
- Reagentiu nevystavujte dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Obsah fľaštičky nesmie zmŕznúť.
- Chráňte obsah fľaštičky pred kontamináciou.
- Nedodržanie postupu merania môže ovplyvniť výsledky testu.
- Reagencia obsahuje azid sodný (NaN_3), ktorý je v čistom stave vysoko toxický, avšak koncentrácia prítomná v tejto reagentii (15 mM) už nieje považovaná za nebezpečnú. Pri likvidácii reagentie 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.

8. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý sa nedodáva

Materiál potrebný na odber periférnej krvi, vhodné skúmavky pre značenie buniek (napr. 12 × 75 mm), sada pipiet s jednorázovými špičkami, centrifúga, vortex, lyzačný roztok, PBS tlmivý roztok, prietokový cytometer.

9. Postup značenia

- Odoberte periférnu krv do sterilnej odberovej skúmavky obsahujúcej antikoagulant (napr. Heparín, EDTA).
- Pipetujte 20 μl reagentie KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control do kontrolnej skúmavky.
- Pridajte 100 μl premiešanej periférnej krvi a zmes premiešajte pomocou vortexu.
- Skúmavku inkubujte 20-30 minút v temne pri laboratórnej teplote.
- Zlyzujte červené krvinky pomocou lyzačného roztoku. Odporúča sa používať komerčné lyzačné činidlo, ktoré

obsahuje formaldehyd a fixuje bunky. Postupujte podľa návodu od výrobcu lyzačného činidla.

- Centrifugujte skúmavku 5 minút pri 300 g.
- Odstráňte supernatant a resuspendujte sediment pomocou 3-4 ml PBS.
- Centrifugujte skúmavku 5 minút pri 300 g.
- Odstráňte supernatant a resuspendujte sediment pomocou 0,3-0,5 ml PBS.
- 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. Analýza dát

Vzorku označenú pomocou reagentie KOMBITEST™ FITC/PE Negative Control analyzujte prietokovým cytometrom. Vykonajte kompenzáciu fluorescenčných signálov nameraných dát. Dáta potom zobrazte v grafe side-scatter (SSC) proti forward-scatter (FSC). Ohraničte populáciu lymfocytov, ako je to znázornené na obrázku 1. Potom zobrazte ohraničené lymfocyty v grafe PE (FL2) proti FITC (FL1), ako je to znázornené na obrázku 2 a nastavte región (gate) odpovedajúci negatívne fluorescenčne označenej populácii lymfocytov.

11. Obmedzenia metódy

- Prietokový cytometer môže poskytovať nepresné výsledky, ak nieje 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.
- Červené krvinky niektorých abnormálnych pacientov môžu byť rezistentné voči lýze pomocou lyzačných roztokov.
- V prípade krvnej vzorky s abnormálne vysokým počtom leukocytov je potrebné vzorku nariediť pomocou PBS na hodnotu približne 5×10^6 leukocytov na ml.
- Krvné vzorky by nemali byť skladované dlhšie ako 24 hodín pred značením.

Example data / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

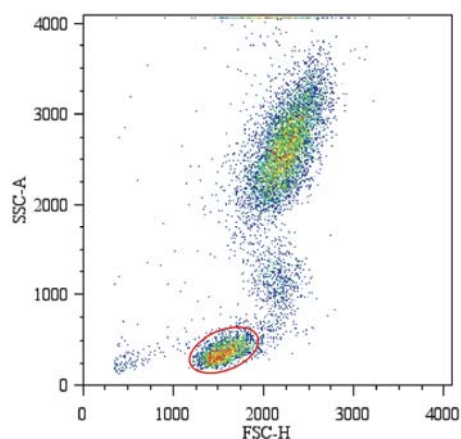


Fig. 1: Delimitation of lymphocyte population

Obr. 1: Ohraničení populace lymfocytů

Obr. 1: Ohraničenie populácie lymfocytov

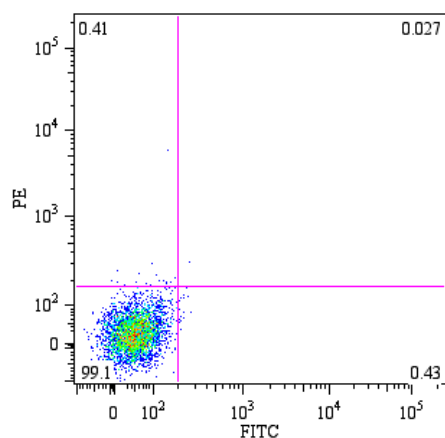


Fig. 2: Negative population of lymphocytes in a dot-plot PE vs. FITC

Obr. 2: Negativní populace lymfocytů v grafu PE vs. FITC

Obr. 2: Negatívna populácia lymfocytov v grafe PE vs. FITC

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

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

<http://www.exbio.cz>