

FLEX
Polyclonal Rabbit
Anti-Human CD3
Ready-to-Use
 (Dako Omnis)

Kód GA503

Použití Pro diagnostiku in vitro.

FLEX Polyklonální králičí antihumánní CD3 připravený k použití (Dako Omnis) je určen pro použití v imunohistochemii (IHC) společně s přístrojem Dako Omnis. Tato protilátka je užitečná při identifikaci T buněk. Výsledky přispívají ke klasifikaci T buněčných novotvarů (1, 2). Diferenční klasifikaci napomáhají výsledky z panelu protilátek. Klinickou interpretaci zbarvení nebo jeho nepřítomnosti je třeba doplnit morfoloogickým vyšetřením s využitím patřičných kontrol a vyhodnotit s přihlédnutím k pacientově klinické anamnéze a k dalším diagnostickým testům provedeným kvalifikovaným patologem. Tato protilátka je určena k použití po primární diagnóze nádoru provedené konvenční histopatologií za použití neimunologických histochemických zbarvení.

Synonyma antigenu T3, CD3 komplex (3).

Souhrn a výklad CD3 CD3 se skládá z nejméně čtyř různých komponent (γ , δ , ϵ , ζ) o molekulové hmotnosti 20–28 kDa. Na povrchu leukocytů je CD3 nekovalentně svázaná s T buněčným receptorem (TCR). Předpokládá se, že CD3 komponenty komplexu TCR/CD3 zprostředkovávají signální transdukcii po rozpoznání antigenu receptorem TCR (4).

CD3 je exprimován T buňkami v brzlíku, kostní dřeni, periferní lymfoidní tkáni a krvi (5, 6). Jediný známý typ normální tkáně, který protilátky na CD3 značí, jsou Purkyňovy buňky v malém mozku (7). CD3 je nejprve zjištěl v raných tymocytech a jeho výskyt představuje jednu z raných známek determinace do linie T-buněk (5). V nezralých tymocytech je exprese CD3 výhradně cytoplazmatická, membránová exprese CD3 se objevuje následně po dozrání buněk (5).

Většina T buněčných novotvarů může exprimovat antigen CD3, zatímco v ne-T buněčných lymfoidních malignitách nebývá přítomná (8). Shodně se vzorem syntézy antigenu v normálních tymocytech je CD3 nejprve detekován v neoplastických buňkách v buněčné cytoplazmě (5).

V příručce *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Obecné pokyny pro imunohistochemické barvení) společnosti Dako nebo v návodu k systému detekce pro IHC metody naleznete informace týkající se těchto témat: Princip metody, Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky, Skladování, Příprava vzorku, Postup barvení, Kontrola kvality, Řešení problémů, Interpretace zbarvení, Obecná omezení.

Dodávaná reagensie Polyklonální králičí protilátka připravená k použití se dodává v kapalné podobě v pufru s obsahem stabilizujícího proteinu a 0,015 mol/l azidu sodného.

Imunogen Syntetický peptid obsahující aminokyseliny 156–168 z cytoplazmatických částí lidského CD3 ϵ -řetězce spojeného s tyreoglobulinem (1).

Specifita Ve Western blotu protilátka detekovala pruhy s očekávanou molekulovou hmotností pro CD3 antigeny (2). Protilátka rozpoznává CD3 ϵ v obou T buněčných liniích (Jurkat) a v linii NK buněk (NK11), ale nereaguje s lyzáty připravenými z několika linií B-buněk (Raji, Ramos a JY), linií myeloidních buněk (U937) nebo linií buněk karcinomu tlustého střeva (Colo-205) (9).

V imunoprecipitaci Nonidet P40 lyzátů T lymfoblastů s jódovaným povrchem protilátka srážela γ (26 kDa), δ (21 kDa) a ϵ (19 kDa) řetězce CD3 molekuly, a to podobně jako při precipitačním vzoru dobře popsané monoklonální myši anti-lidské CD3, klon UCHT1 (1).

Při ELISA testu značila protilátka CD3 peptid použitý jako imunogen.

- Bezpečnostní opatření**
1. K diagnostice in vitro
 2. Určeno pro profesionální uživatele.
 3. Tento výrobek obsahuje azid sodný (NaN₃), který je v čisté formě vysoce toxický. Koncentrace azidu sodného v produktu není sice klasifikována jako nebezpečná, nicméně sloučenina může reagovat s olovem a mědí v odpadním potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy těchto kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů kovů v potrubí.
 4. Jako u každého výrobku biologického původu je nutno dodržovat správné postupy zacházení.
 5. Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky, aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.
 6. Nepotřebované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.

Uchovávání Skladujte při teplotě 2-8 °C. Během skladování musí být víčko uzavřené. Nepoužívejte po datu expirace uvedeném na lahvičce. Aplikační stabilita je 375 hodin. Aplikační stabilitu sleduje software Dako Omnis. Pokud se reagensie skladují za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek, musí uživatel tyto podmínky ověřit. Případná nestabilita výrobku se neprojevuje žádnými známkami. Proto je nutno provádět současně s testováním vzorků pacienta pozitivní a negativní kontroly. Pokud zpozorujete neočekávané zbarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů, a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na technickou podporu společnosti Dako.

Šablona protokolu barvení*

Krok		Komentáře
Fixace/zaliti	Fixováno ve formalínu, zalito v parafínu	Odstranění parafínu v přístroji
Předběžné zpracování	EnVision FLEX, Low pH (kód GV805)	30 min HIER
Protilátka	Ready-to-use	20minutová inkubace
Negativní kontrola	FLEX Negative Control, Rabbit (kód GA600)	20minutová inkubace
Vizualizace	EnVision FLEX (kód GV800) + EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (kód GV809)	Blok: 3 min; Link: 10 min; Polymer: 20 min; Chromogen: 5 min
Kontrastní barvivo	Hematoxylin (kód GC808)	3minutová inkubace
Kontrolní tkáň	Mandle	Membránové a/nebo cytoplazmatické zbarvení
Sklička	FLEX IHC Microscope Slides (kód K8020)	Doporučeno kvůli lepší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům.
Montáž	Je vyžadována bezvodá permanentní montáž	Po barvení je třeba řezu dehydratovat, vyčistit a montovány za použití permanentní montážní metody
Vybavení	Dako Omnis	Činidla se dodávají v ampulkách určených pro příslušný přístroj

*Uživatel se musí vždy seznámit s podrobnými pokyny k barvicímu postupu a s pokyny týkajícími se zacházení s produktem, které jsou uvedené v příbalové informaci.

Příprava vzorku Parafinové řezy: Protilátku lze používat ke značení řezů tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu. Vzorky tkání je nutno rozřezat na řezy o tloušťce 4 μ m.

Předběžné zpracování: Je vyžadováno předběžné zpracování tkáňových řezů fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu tepelně indukovaným vyhledáváním epitopu (HIER). Doporučuje se předběžné zpracování tkání HIER pomocí naředěného roztoku EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), kód GV805. Odstranění parafínu, rehydratace a vyhledání cíle se provádějí v přístroji Dako Omnis. Viz Základní uživatelská příručka Dako Omnis.

Přístroj Dako Omnis zajistí, aby tkáňové řezy během předběžného zpracování a následného imunohistochemického barvení nevyschly. Z důvodu vyšší přilnavosti řezů tkání k podložním sklům se doporučuje používat podložní skla FLEX IHC Microscope Slides, kód K8020.

Postup barvení

Program: V softwaru přístroje Dako Omnis jsou předem naprogramovány kroky barvení a inkubační doby. Podrobné pokyny ke vkládání podložních skl a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis. Pokud není v systému Dako Omnis připraven protokol, kontaktujte technickou podporu výrobce Dako. Všechny kroky inkubace se provádějí při teplotě 32 °C v přístroji Dako Omnis.

Vizualizace: Doporučený vizualizační systém je EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis), kód GV800 ve spojení se systémem EnVision FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis), kód GV809. Vizualizace se provádí v přístroji Dako Omnis.

Poznámka: Pro HIER použijte EnVision FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (Dako Omnis), kód GV805.

Kontrastní barvení: Doporučené kontrastní barvivo je Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808. Kontrastní barvení se provádí v přístroji Dako Omnis.

Montáž: Po provedení barvení v přístroji Dako Omnis se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat pomocí permanentní montážní metody.

Kontrola kvality: Tkáň pro pozitivní a negativní kontroly a také činidlo pro negativní kontrolu je nutno testovat vždy současně použitím stejného protokolu jako vzorky pacienta. Tkáň pro pozitivní kontrolu musí obsahovat mandle a buňky/struktury musí zobrazovat vzor reakce, jak je stanoveno pro tuto tkáň v části „Charakteristiky účinnosti“. Doporučené činidlo pro negativní kontrolu je FLEX Negative Control, Rabbit (Dako Omnis), kód GA600.

Interpretace zbarvení

Buňky značené protilátkou zobrazují cytoplazmatické a/nebo membránové zbarvení.

Charakteristiky účinnosti









Normální tkáně: Protilátka značí T buňky v rozličných tkáních včetně mandlí a tlustého střeva. T buňky v interfolikulárních oblastech a v zárodečných centrech mandlí vykazovaly středně silnou až silnou reakci zbarvení.

Abnormální tkáně: Protilátka značila 73/96 T-buněčných novotvarů, včetně 7/9 lymfoblastických, 25/35 pleomorfických, 5/5 imunoblastických, 5/5 angioimunoblastických podobných lymfadenopatickým, 2/2 lymfomům T zóny, 19/19 mycosis fungoides/Sézaryho syndromů, 2/3 Lennertových lymfomů, 4/13 Ki-1 pozitivních anaplastických lymfomů z velkých buněk, 3/4 lymfomatoidních papulóz, 1/1 břišního lymfomu (1). Protilátka značila 149/149 případů akutních lymfoblastických leukémií z prekurzorových T-buněk/lymfomů (ALL). V 131/149 případech bylo 100 % buněk označených, v 14 případech bylo označeno 50-90 % buněk a ve čtyřech případech bylo označeno méně než 50 % buněk. Žádné barvení nebylo zpozorováno v 68/68 případech ALL z B-buněk (prekurzorových), kromě reaktivních infiltrujících T-buněk (2).

Literatura

- Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, et al. Detection of cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. J Clin Pathol 1989; 42:1194-1200.
- Pilozzi E, Pulford K, Jones M, Müller-Hermelink H-K, Falini B, Ralfkiaer E, et al. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. J Pathol 1988; 186:140-3.
- CD guide In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1111.
- Jacobs H. Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 complexes: decamers with differential signalling properties? Immunol Today 1997; 18:565-9.
- Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol 1987; 138:648-55.
- Tunnacliffe HA, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, De la Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 295-6.
- Garson JA, Beverley PC, Coakham HB, Harper EI. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. Nature 1982; 298:375-7.
- Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet 1986; i:761-5.
- Lanier LL, Chang C, Spitz H, Phillips JH. Expression of cytoplasmic CD3ε proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. J Immunol 1992; 149:1876-80.

Vysvětlivky k symbolům

 REF	Katalogové číslo	 2 °C - 8 °C	Teplotní rozmezí od do		Použitelné do
 IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředek	 LOT	Číslo šarže		Výrobce
 i	Viz návod k použití	 EC REP	Autorizovaný zástupce v Evropské unii		



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.
No. 1 Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com