

exbio

KOMBITEST T Cell 4-color 50 testów | Nr kat. ED7734

IVD **CE**₂₂₆₅

Instrukcja użycia (PL)

Wersja: ED7734_IFU_v3_PL

Data wydania: 17.04.2025 r.

Symbole stosowane w oznakowaniu urządzeń

IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Ograniczenie temperatury
CE ₂₂₆₅	Znak zgodności CE Numer identyfikacyjny organu notyfikowanego		Przechowywać poza zasięgiem światła słonecznego
	Producent	UKCA	Znak UKCA
UDI	Unikalny identyfikator urządzenia		
	Zapoznaj się z instrukcją użycia		
	Zawiera ilość wystarczającą na <n> testów		
REF	Numer katalogowy		
LOT	Kod partii		
	Termin przydatności do użycia		

1. Przeznaczenie

KOMBITEST T Cell 4-color jest przeznaczony do wykrywania i zliczania populacji i podzbiorów limfocytów w ludzkiej krwi pełnej za pomocą cytometrii przepływowej.

Co jest wykrywane i/lub mierzone

KOMBITEST T Cell 4-color wykrywa i mierzy względne wartości procentowe i bezwzględne liczby ludzkich limfocytów T (CD3+), pomocniczych/indukujących (CD3+CD4+) i supresorowych/cytotoksycznych (CD3+CD8+) podzbiorów limfocytów T.

Funkcja urządzenia

Urządzenie jest przeznaczone do oceny immunologicznej zdrowych pacjentów i może pomóc w diagnozowaniu pacjentów z niedoborem odporności lub z podejrzeniem tego niedoboru.

Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego

Mierzone częstotliwości populacji limfocytów mogą być uzależnione od różnych stanów patologicznych, a ocena ich odsetka i liczby może być wykorzystana do oceny:

- Limfocyty T pomocnicze/indukujące CD3+/CD4+ w monitorowaniu HIV (1, 4, 5, 7)
- Limfocyty T cytotoksyczne CD3+/CD8+ w zakażeniach wirusowych i dziedzicznych niedoborach odporności (2, 3, 4, 9, 10, 11, 13)

Rodzaj testu

Nie zautomatyzowany

Ilościowy

Wymagany rodzaj próbki

Próbka ludzkiej pełnej krwi obwodowej z antykoagulantem.

Populacja testowa

Nie jest przeznaczony dla określonej populacji.

2. Użytkownik

Urządzenie jest przeznaczone wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego. Nie służy do badań przyłóżkowych ani do samodzielnych badań.

Wymagania dotyczące kwalifikacji

Docelowy użytkownik powinien posiadać najnowszą wiedzę specjalistyczną w zakresie analizy cytometrii przepływowej komórek ludzkich, standardowych technik laboratoryjnych, w tym umiejętności pipetowania oraz bezpiecznego i właściwego obchodzenia się z próbkami pobranymi z organizmu ludzkiego.

Docelowy użytkownik musi przestrzegać normy EN ISO 15189 lub innych norm krajowych jeśli takowe istnieją.

3. Zasada testu

Zasada testu opiera się na wykrywaniu przeciwciała monoklonalnego wiążącego się ze specyficzną cząsteczką (antygenem) ekspresjonowaną przez określone ludzkie krwinki. Przeciwciała monoklonalne użyte w teście są znakowane różnymi fluorochromami, które są wzbudzane wiązką laserową z cytometru przepływowego podczas pobierania próbki krwi barwionej przeciwciałami. Późniejsza fluorescencja (emisja światła) każdego fluorochromu obecnego w pobranej komórce krwi jest zbierana i analizowana przez urządzenie. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do gęstości ekspresji antygeny w komórce, co pozwala na rozdzielenie różnych podzbiorów komórek.

4. Dostarczone odczynniki

Zawartość

KOMBITEST T Cell 4-color wystarcza na 50 testów i jest dostarczany z następującym odczynnikiem:

1 fiołka (1 ml) zawierająca wstępnie zmieszaną kombinację znakowanych fluorochromem przeciwciał monoklonalnych CD3 FITC / CD45 PerCP / CD4 APC / CD8 PE, rozcieńczonych do optymalnych stężeń w stabilizującym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) zawierającym azydek sodu 15 mM i 0,2% albuminy surowicy bydlęcej (BSA).

Skład

Tabela 1 Opis składników aktywnych

Antygen	Fluorochrom	Klon	Izotyp	Stężenie (µg/ml)
CD3	FITC	TB3	IgG2b	2
CD4	APC	MEM-241	IgG1	1,5
CD8	PE	LT8	IgG1	0,6
CD45	PerCP	MEM-28	IgG1	5

5. Materiały wymagane, nie będące w zestawie

Probówki okrągłodenne (12 x 75 mm)

Roztwór do lizy erytrocytów (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., nr kat. ED7066 or CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, nr. kat. BD303500)

Woda dejonizowana (do odczynników)

Komórki kontroli procesu (Streck CD-Chex Plus® , nr kat. 213323 lub równoważna kontrola komórek ulegających lizie)

6. Wymagany sprzęt

Pipeta automatyczna z jednorazowymi końcówkami (20 - 100 µl) do pipetowania próbek i odczynników

Dozownik lub pipeta do płynów z jednorazowymi końcówkami (0,5 – 2 ml) do dozowania roztworu do lizy erytrocytów

Mieszadło wirowe

Analizator hematologiczny (do bezwzględnego zliczania krwinek) zdolny do oznaczania liczby białych krwinek (WBC) i limfocytów na µl próbki

Cytometr przepływowy z dwoma laserowymi źródłami wzbudzenia (488 nm i ~635 nm), detektorami światła rozproszonego, filtrami optycznymi i detektorami emisji odpowiednimi do zbierania sygnałów z fluorochromów przedstawionych w tabeli 2.

Tabela 2 Charakterystyka widmowa fluorochromów zastosowanych w urządzeniu

Fluorochrom	Wzbudzenie [nm]	Emisja [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP	488	677
APC	630 – 640	660

UWAGA: Urządzenie zostało przetestowane na cytometrach przepływowych BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), DxFLEx (Beckman Coulter) i Sysmex XF-1600™ (Sysmex Corporation).

7. Przechowywanie

Przechowywać w temperaturze 2–8°C.

Unikać długotrwałej ekspozycji na światło.

Nie zamrażać.

Patrz punkt 10 Procedura (Przygotowanie odczynników), aby uzyskać informacje na temat stabilności podczas użycia i okresu ważności po pierwszym otwarciu, a także warunków przechowywania i stabilności roztworów roboczych (jeśli dotyczy).

8. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia użytkowania

Klasyfikacja zagrożeń GHS

Zapoznaj się z kartą charakterystyki (SDS) dostępną na stronie produktu pod adresem www.exbio.cz, aby uzyskać pełne informacje na temat zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne i mieszaniny zawarte w produkcie oraz jak należy się z nimi obchodzić i jak je utylizować.

Zagrożenie biologiczne

Ludzkie próbki biologiczne i próbki krwi oraz wszelkie materiały mające z nimi kontakt są zawsze uważane za materiały zakaźne.

Stosować środki ochrony osobistej i bezpieczeństwa, aby uniknąć kontaktu ze skórą, oczami i błonami śluzowymi.

Postępować zgodnie ze wszystkimi obowiązującymi przepisami prawa, regulacjami i procedurami dotyczącymi obchodzenia się z materiałami zakaźnymi i ich usuwania.

Oznaki pogorszenia jakości

Normalny wygląd dostarczonego odczynnika to klarowny płyn. Nie używać odczynnika w przypadku zauważenia jakiegokolwiek zmiany w jego wyglądzie, na przykład zmętnienia lub osadu.

Ograniczenie użytkowania

Nie stosować po upływie daty ważności podanej na etykiecie produktu.

9. Próbka

Stosować żyłą krew obwodową pobraną do pojemnika na próbki sklasyfikowanego jako wyrób medyczny z antykoagulantem EDTA.

UWAGA: określić bezwzględną liczbę krwinek białych i liczbę limfocytów w pobranej próbce krwi za pomocą analizatora hematologicznego. Sam KOMBITEST T Cell 4-color nie zapewnia zliczenia bezwzględnej liczby komórek.

Próbka krwi z liczbą WBC przekraczającą 40×10^3 komórek/ μ l będzie wymagać rozcieńczenia PBS przed przetwarzaniem próbki.

Próbkę krwi należy poddać obróbce nie później niż 24 godziny po pobraniu. Próbkę przechowywać w temperaturze laboratoryjnej (20–25°C). Nie przechowywać próbki w lodówce.

Interferencja endogenna

Na podstawie badań literatury naukowej w Tabeli 3 przedstawiono endogenne źródła zakłóceń.

Tabela 3 Endogenna interferencja urządzenia

Interferencja endogenna	Wpływ	Odniesienie
Albumina	Albumina może zakłócać działanie w wysokich stężeniach ze względu na swoją zdolność do wiązania i uwalniania dużych ilości ligandów.	14, 15, 31
Bilirubina (żółta) (niesprzężona)	Bilirubina może zwiększać tło fluorescencji komórek ze względu na wysoką	18, 20, 24

	autofluorescencję.	
Pozostałości komórek (po lizie)	Szczątki komórek mogą powodować błędy w liczeniu komórek i wyczerpanie przeciwciał w urządzeniu.	17, 21
Erytrocyty	Niewystarczająca liza, obecność czerwonych krwinek w próbce może skutkować błędnym zliczeniem komórek.	22
Hemoglobina	Próbki zhemolizowane mogą dawać błędne wyniki.	19
Ludzkie przeciwciała przeciw mysim	Leczenie przeciwciałami monoklonalnymi może dawać błędne wyniki (zdolność wiązania się z antygenami powierzchniowymi komórki).	16, 26, 27, 28, 29, 30
Immunoglobuliny	Nie można myć metodą jednoplatformową i może to skutkować błędną liczbą podzbiorów limfocytów.	17
Czynniki reumatoidalne	Obecność RF zakłóca MIA (multipleksowe testy immunologiczne).	23
Trójglicerydy	Wysoki poziom lipidów w krążeniu może wpływać na analizę cytometrii przepływowej niektórych populacji komórek krwi.	25

Zakłócenia egzogenne

Próbka starsza niż 24 godziny może dawać błędne wyniki.

Próbka przechowywana w lodówce może dawać błędne wyniki.

Niewłaściwe przygotowanie roztworu do lizy erytrocytów (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., nr kat. ED7066 lub CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, nr kat. nr BD303500) może dawać błędne wyniki. Postępuj zgodnie z instrukcjami producenta dotyczącymi stosowania roztworu do lizy erytrocytów.

10. Procedura

Przygotowanie dostarczonych odczynników

Przygotowanie odczynnika nie jest konieczne.

Przed użyciem doprowadzić odczynnik do temperatury pokojowej. Utrzymywać główny pojemnik urządzenia w stanie suchym.

Użyć odczynnika bezpośrednio z jego oryginalnego pojemnika podstawowego. Czas użytkowania odczynnika (wystawienie na działanie światła i podwyższonej temperatury) nie powinien przekraczać 4 godzin dziennie.

Po pierwszym otwarciu odczynnik zachowuje swoje właściwości użytkowe do daty ważności, jeśli jest przechowywany w określonych warunkach w oryginalnym pojemniku podstawowym.

UWAGA: nie rozcieńczać odczynnika.

Przygotowanie wymaganych, a nie zawartych w zestawie materiałów

Rozcieńczyć stężony roztwór do lizy erytrocytów wodą dejonizowaną zgodnie z zaleceniami producenta. Rozcieńczony (1X) roztwór do lizy erytrocytów jest stabilny przez 1 miesiąc, jeśli jest przechowywany w dozowniku cieczy lub zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej.

Kontrola jakości

Użyć Streck CD-Chex Plus® lub równoważnych komórek kontrolnych jako pozytywnej kontroli proceduralnej, aby zapewnić prawidłowe działanie urządzenia zgodnie z przeznaczeniem. Streck CD-Chex Plus® zapewnia ustalone wartości procentowe dodatnich i bezwzględnych zliczeń limfocytów T, limfocytów B, granulocytów, monocytów i komórek NK, w tym dwóch klinicznie istotnych poziomów komórek CD4+.

Zabarwić krew kontrolną za pomocą odczynnika KOMBITEST T Cell 4-color zgodnie z przetwarzaniem próbki w sposób określony w instrukcji obsługi. Sprawdzić, czy uzyskane wyniki (% komórek dodatnich) mieszczą się w oczekiwanym zakresie podanym dla używanej serii komórek kontrolnych.

Barwienie próbek

1. Dla każdej próbki oznaczyć okrągłodenną probówkę o wymiarach 12 × 75 mm odpowiednią identyfikacją próbki.
2. Wprowadzić za pomocą pipety 20 µl odczynnika KOMBITEST T Cell 4-color na dno probówki o wymiarach 12 x 75 mm.
3. Nanieść za pomocą pipety 50 µl dobrze wymieszanej próbki krwi na dno probówki.

UWAGA: unikać pipetowania krwi po ściance probówki. Jeśli rozmaz lub kropla krwi pozostanie na ściance probówki, może ona nie zostać zabarwiona odczynnikiem lub erytrocyty mogą nie ulec lizie, przez co wynik testu może być nieważny.

4. Wytrząsać i inkubować probówkę przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
5. Dodać do probówki 500 µl rozcieńczonego (1X) roztworu do lizy.
6. Wytrząsać i inkubować probówkę przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.

Natychmiast pobrać zabarwioną próbkę na cytometr przepływowy. Jeżeli wybarwionej próbki nie da się natychmiast pobrać, przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C i analizować w ciągu 24 godzin.

UWAGA: wirować zabarwioną próbkę bezpośrednio przed akwizycją w cytometrze przepływowym, aby uniknąć tworzenia się agregatów.

Analiza metodą cytometrii przepływowej

Cytometr przepływowy dobrany do współpracy z KOMBITEST T Cell 4-color należy rutynowo kalibrować przy użyciu mikrokulek fluorescencyjnych, aby zapewnić stabilną czułość detektorów zgodnie z instrukcjami producenta cytometru.

W przypadku nieprawidłowej konserwacji cytometr przepływowy może dawać fałszywe wyniki.

Patrz specyfikacje cytometru producenta dotyczące laserów i detektorów fluorescencyjnych zgodnie z charakterystyką wzbudzenia i emisji fluorochromów w rozdziale 6. Wymagany osprzęt.

Ustawić napięcia na odpowiednich detektorach fluorescencyjnych przed analizą zabarwionej próbki. Napięcie na detektorze PMT powinno być ustawione na tyle wysoko, aby jak najmniej zdarzeń wybarwionych ujemnie zakłócało kanał 0 na osi fluorescencji. Również napięcie detektora PMT nie powinno przekraczać wartości, przy których dodatnie zdarzenia są dociskane do prawej osi.

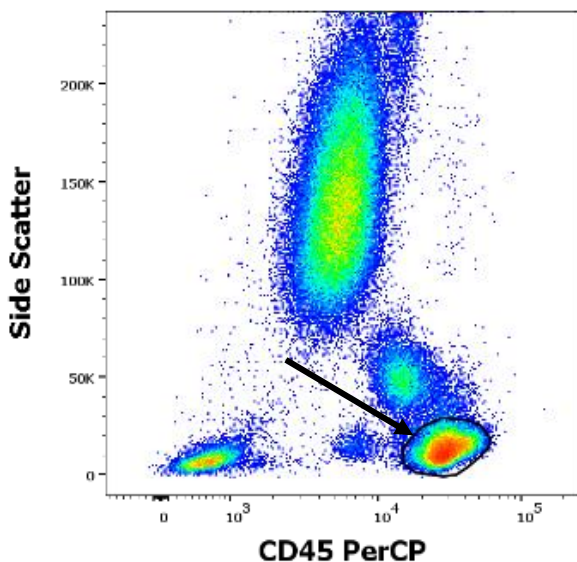
Kompensacja sygnałów fluorescencji między detektorami przed lub po akwizycji danych. Dane mogą być nieprawidłowo interpretowane, jeśli sygnały fluorescencyjne są niewłaściwie kompensowane lub jeśli bramki są ustawione niedokładnie.

Do analizy danych pomiarowych można wykorzystać oprogramowanie cytometryczne opracowane przez producenta lub oprogramowanie dedykowane do analizy danych cytometrycznych offline (np. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analiza danych barwionej próbki KOMBITEST T Cell 4-color

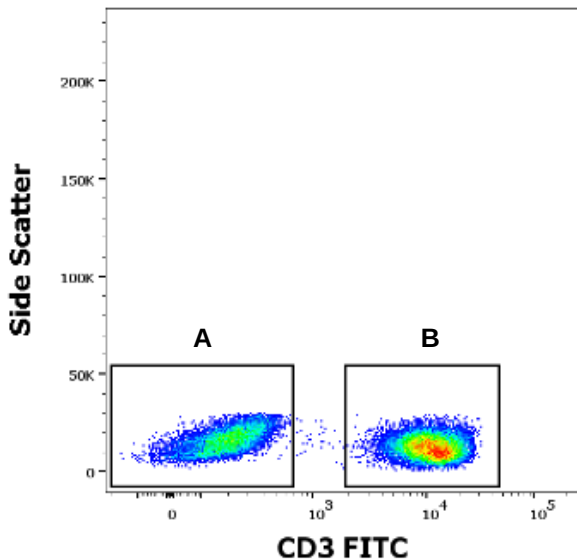
Zwizualizować skompensowane dane na wykresie rozproszenia bocznego (SSC) w porównaniu z CD45 PerCP. Ustawić bramkę dla populacji limfocytów CD45+, jak pokazano na rysunku 1.

Rysunek 1 Określenie populacji limfocytów CD45+
(dane zebrane na BD FACSCanto™ II)



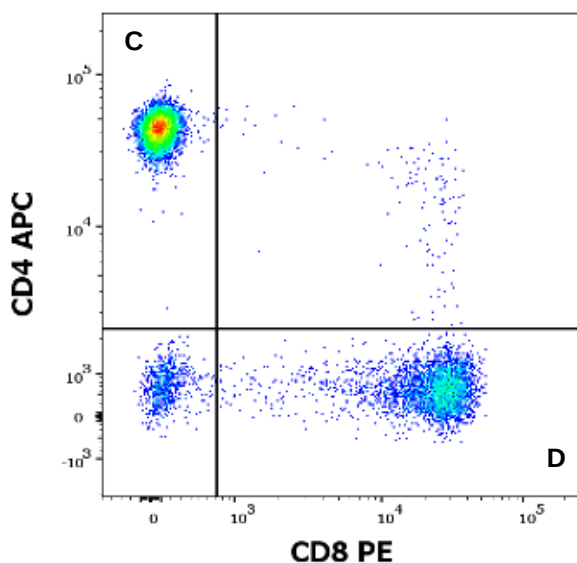
Wykreślić bramkowane limfocyty CD45+ na wykresie rozproszenia bocznego (SSC) względem CD3 FITC, jak pokazano na rysunku 2. Oddzielić limfocyty CD3+ i CD3- za pomocą odpowiednich bramek. Obliczyć procent limfocytów T (CD3+; region B na rysunku 2) ze wszystkich limfocytów.

Rysunek 2 Separacja limfocytów CD3+ i CD3-
(dane zebrane na BD FACSCanto™ II)



Nakreślić bramkowane limfocyty T (CD3+; region B na rysunku 2) jako CD4 APC w porównaniu z CD8 PE, jak pokazano na rysunku 3. Ustawić odpowiednie bramki i obliczyć procent limfocytów T pomocniczych/indukujących (CD4+CD8-; region C na rysunku 3) i supresorowych/cytotoksycznych limfocytów T (CD4-CD8+; region D na rysunku 3) ze wszystkich limfocytów.

Rysunek 3 Limfocyty CD3+ na wykresie punktowym CD4 APC vs. CD8 PE
(dane zebrane na BD FACSCanto™ II)



Obliczanie i interpretacja wyników analiz

Aby uzyskać liczbę bezwzględną, należy użyć bezwzględnej liczby limfocytów określonej przez analizator hematologiczny. Patrz instrukcje producenta analizatora hematologicznego. Użyć poniższych równań do bezwzględnego zliczenia wymaganego podzbioru limfocytów.

$$A \times \frac{B (\%)}{100 (\%)} = \text{Bezwzględna liczba wymaganego podzbioru limfocytów}$$

A = bezwzględna liczba limfocytów (dane z analizatora hematologicznego; komórki / μ l)

B = względne wartości procentowe wymaganego podzbioru limfocytów ze wszystkich limfocytów (dane z cytometru przepływowego; %)

11. Wydajność analityczna

Specyficzność

Przeciwciało TB3 rozpoznaje ludzki antygen CD3 z kompleksu TCR/CD3. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA XI).

Przeciwciało MEM-241 rozpoznaje ludzki antygen CD4 (glikoproteina powierzchniowa CD4 komórek T). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA VIII).

Przeciwciało LT8 rozpoznaje ludzki antygen CD8 (dimer połączony mostkiem dwusiarczkowym wyrażany jako dwa homodimery łańcucha alfa CD8 lub heterodimery łańcucha alfa/beta CD8). Specyficzność przeciwciała została potwierdzona przez warsztaty HLDA (warsztaty HLDA V ⁽¹²⁾ i warsztaty HLDA VII⁽⁶⁾).

Przeciwciało MEM-28 rozpoznaje wszystkie izoformy leukocytów ludzkiego CD45 (receptor białkowej fosfatazy tyrozynowej typu C). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztaty HLDA (warsztaty HLDA III ⁽⁸⁾).

Dokładność

Dokładność metody mierzono na cytometrze przepływowym BD FACSCanto™ II i określono poprzez porównanie urządzenia KOMBITEST T Cell 4-color z podobnym produktem dostępnym na rynku KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, nr kat. ED7733) przez równoległe barwienie 60 zdrowych dawców krwi.

Na cytometrach przepływowych Beckman Coulter DxFLEx i Sysmex XF-1600™ dokładność metody określono przez porównanie wyników analizy tych samych próbek krwi od 37 zdrowych dawców barwionych urządzeniem KOMBITEST T Cell 4-color na cytometrach przepływowych BC DxFLEx i BD FACSCanto™ II oraz na cytometrach przepływowych Sysmex XF-1600™ i BD FACSCanto™ II.

Dokładność metody została potwierdzona równoległym barwieniem próbek od 104 pacjentów (patrz tabela 7) z podejrzeniem stanu patologicznego układu odpornościowego. Parametry analizy regresji liniowej przedstawiono w tabelach 4–7.

Tabela 4 Analiza regresji liniowej dla podzbiorów limfocytów u zdrowych dawców (porównanie urządzenia KOMBITEST T Cell 4-color z odczynnikiem produktu IVD KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, nr kat. ED7733))

Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwyt	R ²
CD3+	%	60	0,9956	+0,0071	0,9906
	komórek/ μ l	60	1,0026	4,1341	0,9983
CD3+CD8+	%	60	0,9522	-0,0003	0,9792
	komórek/ μ l	60	0,9375	6,8895	0,9878
CD3+CD4+	%	60	0,9677	0,0259	0,9708
	komórek/ μ l	60	1,0198	10,174	0,9875

n = liczba próbek krwi

Tabela 5 Analiza regresji liniowej podzbiorów limfocytów u zdrowych dawców (porównanie analizowanych próbek krwi barwionych urządzeniem ED7734 na urządzeniu Beckman Coulter DxFLEx z BD FACSCanto™ II)

Dokładność pomiaru ED7734 na Beckman Coulter DxFLEx					
Cytometr przepływowy Beckman Coulter DxFLEx a cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II					
Prawdziwość pomiaru					
Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwyt	R ²
CD3+	%	37	1,0207	0,0188	0,9678
	komórek/ μ l	37	1,0009	8,4158	0,9968
CD3+CD8+	%	37	1,0241	0,0016	0,9955
	komórek/ μ l	37	1,0242	3,0245	0,9986
CD3+CD4+	%	37	0,9644	0,0045	0,9719
	komórek/ μ l	37	0,9479	21,0470	0,9884

n = liczba próbek krwi

Tabela 6 Analiza regresji liniowej podzbiorów limfocytów u zdrowych dawców (porównanie analizowanych próbek krwi barwionych urządzeniem ED7734 na Sysmex XF-1600™ z BD FACSCanto™ II)

Dokładność pomiaru ED7734 na Sysmex XF-1600™					
Cytometr przepływowy Sysmex XF-1600™ a cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II					
Prawdziwość pomiaru					
Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwyt	R²
CD3+	%	37	1,0297	0,0135	0,9766
	komórek/ μ l	37	1,0151	5,7134	0,9977
CD3+CD8+	%	37	1,0305	0,0140	0,9853
	komórek/ μ l	37	0,9921	9,6954	0,9927
CD3+CD4+	%	37	0,9752	0,0151	0,9845
	komórek/ μ l	37	0,9883	17,9040	0,9953

n = liczba próbek krwi

Tabela 7 Analiza regresji liniowej dla podzbiorów limfocytów u pacjentów z podejrzeniem stanów patologicznych układu odpornościowego (porównanie urządzenia KOMBITEST T Cell 4-color z systemem do cytometrii przepływowej AQUIOS CL – Beckman Coulter, Inc. i akredytowaną metodą wewnętrzną laboratorium klinicznego – koktajl skoniugowanych jednobarwnych przeciwciał różnych producentów i analiza na BD FACSCanto™ II)

Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwyt	R²
CD3+	%	104	0,944	3,774	0,98
	komórek/ μ l	104	0,927	0,123	0,96
CD3+CD8+	%	104	0,944	1,727	0,99
	komórek/ μ l	104	0,911	0,071	0,98
CD3+CD4+	%	104	1,005	0,316	0,99
	komórek/ μ l	104	1,009	0,013	0,99

n = liczba próbek krwi

Liniowość

Liniowość metody zweryfikowano na 10 seryjnych rozcieńczeniach próbki krwi wzbogaconej w leukocyty (kożuszek leukocytny). Próbki komórek barwiono za pomocą KOMBITEST T Cell 4-color w heksaplikacjach. Próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II, cytometru przepływowego Beckman Coulter DxFLEX i cytometru przepływowego Sysmex XF-1600™. Zaobserwowano, że zmierzone dane dla wskazanych podzbiorów limfocytów były liniowe w zakresie limfocytów 40-10546 komórek/ μ l przy użyciu BD FACSCanto™ II, 15-10519 komórek/ μ l przy użyciu Beckman Coulter DxFLEX i 45-11892 komórek/ μ l przy użyciu Sysmex XF-1600™. Podzbiory komórek mieściły się w zakresach podanych w tabelach 8–10.

Tabela 8 Liniowe zakresy podzbiorów limfocytów analizowane przez BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	
Podzbiór limfocytów	Zakres (komórki/ μ l)
CD3+	31–7302
CD3+CD8+	9–2182
CD3+CD4+	17–4080

Tabela 9 Liniowe zakresy podzbiorów limfocytów analizowane przez Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX	
Podzbiór limfocytów	Zakres (komórki/ μ l)
CD3+	10–7268
CD3+CD8+	3–2297
CD3+CD4+	6–3940

Tabela 10 Liniowe zakresy podzbiorów limfocytów analizowane przez Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™	
Podzbiór limfocytów	Zakres (komórki/ μ l)
CD3+	33–7386
CD3+CD8+	12–2792
CD3+CD4+	19–4179

Granica wykrywalności / Granica oznaczalności / Punkt odcięcia testu

Dane dotyczące liniowości wykorzystano do określenia granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ).

Granice wykrywalności określono jako najniższą niezerową bezwzględną liczbę komórek plus $3 \times SD$ (odchylenie standardowe) dla każdego podzbioru limfocytów (patrz Tabele 11–13).

Granice oznaczalności określono jako najniższą wartość w zakresie liniowości stężeń analitów przedstawioną jako bezwzględna liczba podzbioru limfocytów, przy której CV z heksaplikatów nie przekraczało 10% a odzysk mieścił się w zakresie 90–110% (patrz Tabele 11–13).

Wyniki testu nie są jednoznacznie diagnostyczne dla pojedynczej jednostki klinicznej, dlatego nie można oszacować wartości odcięcia testu.

Tabela 11 Granice wykrywalności i oznaczalności na BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II				
Podzbiór limfocytów	Najniższa niezerowa liczba komórek (komórki na μ l)	$3 \times SD$ (SD)	LOD (komórki na μ l)	LOQ (komórki na μ l)
CD3+	1	0,6 (0,2)	1,6	3
CD3+CD8+	1	0,6 (0,2)	1,6	9
CD3+CD4+	1	0,6 (0,2)	1,6	2

Tabela 12 Granice wykrywalności i oznaczalności na Beckman Coulter DxFLEx

Beckman Coulter DxFLEx				
Podzbiór limfocytów	Najniższa niezerowa liczba komórek (komórki na μ l)	$3 \times SD$ (SD)	LOD (komórki na μ l)	LOQ (komórki na μ l)
CD3+	1	0,3 (0,1)	1,3	3
CD3+CD8+	1	0,6 (0,2)	1,6	3
CD3+CD4+	2	0,6 (0,2)	2,6	6

Tabela 13 Granice wykrywalności i oznaczalności na Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™				
Podzbiór limfocytów	Najniższa niezerowa liczba komórek (komórki na μ l)	$3 \times SD$ (SD)	LOD (komórki na μ l)	LOQ (komórki na μ l)
CD3+	1	0,3 (0,1)	1,3	1
CD3+CD8+	2	2,7 (0,9)	4,7	4
CD3+CD4+	1	0,6 (0,2)	1,6	2

Powtarzalność

Powtarzalność testu mierzono na dziesięciu próbkach krwi w heksaplikacjach. Próbkę analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II, cytometru przepływowego Beckman Coulter DxFLEx i cytometru przepływowego Sysmex XF-1600™. Współczynniki zmienności (CV) przedstawiono w poniższych tabelach (tabela 14 i 16).

Tabela 14 Powtarzalność urządzenia na BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Średnio	SD	%CV
CD3+	%	10	69,27	0,34	0,51
	komórek/ μ l	10	1408	7,3	
CD3+CD8+	%	10	22,40	0,23	1,16
	komórek/ μ l	10	449	4,7	
CD3+CD4+	%	10	42,21	0,28	0,68
	komórek/ μ l	10	864	6,0	

n = liczba próbek krwi

Tabela 15 Powtarzalność urządzenia na Beckman Coulter DxFLEx

Beckman Coulter DxFLEx					
Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Średnio	SD	%CV
CD3+	%	10	68,26	0,43	0,67
	komórek/ μ l	10	1389	10,1	
CD3+CD8+	%	10	22,61	0,23	1,15
	komórek/ μ l	10	454	4,6	
CD3+CD4+	%	10	41,04	0,45	1,09
	komórek/ μ l	10	842	10,1	

n = liczba próbek krwi

Tabela 16 Powtarzalność urządzenia na Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™					
Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Średnio	SD	%CV
CD3+	%	10	71,77	0,54	0,78
	komórek/ μ l	10	1275	9,6	
CD3+CD8+	%	10	26,39	0,24	0,90
	komórek/ μ l	10	474	4,4	
CD3+CD4+	%	10	41,12	0,48	1,14
	komórek/ μ l	10	723	8,5	

n = liczba próbek krwi

Odtwarzalność

Powtarzalność testu na BD FACSCanto™ II i Beckman Coulter DxFLEX mierzono na 2 stabilizowanych próbkach krwi (CD-Chex Plus® i CD-Chex Plus® CD4 Low firmy STRECK). Powtarzalność testu Sysmex XF-1600™ mierzono na 2 stabilizowanych próbkach krwi (IMMUNO-TROL Low Cells i IMMUNO-TROL Cells firmy Beckman Coulter dodatkowo). Próbkę mierzono w tych samych warunkach przez 15 dni, używając 3 serii urządzenia (po 5 dni każda). Współczynniki zmienności (CV) podano w poniższych tabelach (Tabele 17–19).

Tabela 17 Odtwarzalność urządzenia na BD FACSCanto™ II

Podzbiór limfocytów	Materiał	Jednostka	Średnio	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76,60	0,35	0,45
		komórek/ μ l	1888	8,5	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60,07	0,40	0,67
		komórek/ μ l	872	5,8	
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23,68	0,24	1,03
		komórek/ μ l	584	6,0	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42,19	0,28	0,67
		komórek/ μ l	612	4,1	
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	48,99	0,37	0,75
		komórek/ μ l	1209	9,0	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12,77	0,26	2,03
		komórek/ μ l	185	3,8	

Tabela 18 Odtwarzalność urządzenia na Beckman Coulter DxFLEx

Podzbiór limfocytów	Materiał	Jednostka	Średnio	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76,67	0,44	0,58
		komórek/ μ l	1891	10,9	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60,36	0,39	0,64
		komórek/ μ l	876	5,63	
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23,79	0,32	1,34
		komórek/ μ l	567	7,85	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42,91	0,36	0,84
		komórek/ μ l	623	5,21	
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	48,70	0,40	0,83
		komórek/ μ l	1201	9,95	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12,59	0,21	1,65
		komórek/ μ l	183	3,02	

Tabela 19 Odtwarzalność urządzenia na Sysmex XF-1600™

Podzbiór limfocytów	Materiał	Jednostka	Średnio	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	71,77	0,66	0,92
		komórek/ μ l	755	6,9	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	55,05	0,45	0,82
		komórek/ μ l	483	4,0	
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	24,87	0,55	2,20
		komórek/ μ l	262	5,8	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	41,41	0,59	1,43
		komórek/ μ l	363	5,2	
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	42,62	0,57	1,33
		komórek/ μ l	448	6,0	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	9,72	0,35	3,62
		komórek/ μ l	85	3,1	

UWAGA: wszystkie dane dotyczące wydajności analitycznej zostały zmierzone przy użyciu roztworu do lizy erytrocytów EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., nr kat. ED7066).

Do analizy metodą cytometrii przepływowej wykorzystano następujące cytometry przepływowe wraz z wersją oprogramowania:

BD FACSCanto™ II	BD FACSDiva Software – wersja 8.0.2
Beckman Coulter DxFLEX	CytExpert for DxFLEX – wersja 2.0.2.18
Sysmex XF-1600™	IPU Software – wersja 0(0.09-00)

Do bezwzględnego zliczenia komórek zastosowano analizator hematologiczny metodą dwuplatformową o następujących parametrach:

Sysmex XN-1000™	IPU Software – wersja 00-22(164)
-----------------	----------------------------------

Do oceny zmierzonych danych wykorzystano platformę analityczną: FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - wersja 10.9.0

12. Wydajność kliniczna

Pacjenci z nabytym niedoborem odporności

Dane kliniczne zebrano w ośrodku klinicznym od 53 pacjentów z potwierdzonym zakażeniem ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV). Kliniczne działanie urządzenia określono na podstawie porównania urządzenia KOMBITEST T Cell 4-color z roztworem do lizy erytrocytów EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., nr kat. ED7066) z metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego (koktajl skoniugowanych jednokolorowych przeciwciał różnych producentów i analiza na BD FACSCanto™ II).

Wyniki oceny statusu immunologicznego pacjentów oceniano pod kątem niedoboru odporności (tabela 20).

Tabela 20 Wydajność kliniczna urządzenia KOMBITEST T Cell 4-color – pacjenci z HIV

		Stan odporności oceniany metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego	
		Niedobór odporności	Normalna kondycja
Stan odporności oceniany aparatem KOMBITEST T Cell 4-color	Niedobór odporności	28 z 29 pacjentów*	0 pacjentów
	Normalna kondycja	0 pacjentów	24 pacjentów

OSTRZEŻENIE:

* Urządzenie KOMBITEST T Cell 4-color nie wybarwiło antygenu CD3 na limfocytach T u jednego (1) pacjenta z HIV w stanie krytycznym.

13. Oczekiwane wartości

Interwał odniesienia

Tabela 21 Odstępy referencyjne zdrowych dawców krwi mierzone na BD FACSCanto™ II

Podzbiór limfocytów	n	Jednostka	Zakres		Mediana
			Min.	Maks.	
CD3+	97	%	51,5	87,1	72,3
	97	komórek/ μ l	766	2864	1383
CD3+CD8+	97	%	10,1	47,2	23,9
	97	komórek/ μ l	132	1307	442
CD3+CD4+	97	%	23,8	59,5	41,8
	97	komórek/ μ l	393	1337	798

Przedziały referencyjne podane w tabeli 21 ustalono dla zdrowych pacjentów, którzy zgodnie z ustawodawstwem Republiki Czeskiej byli uznawani za dawców krwi, spełniając rygorystyczne kryteria stawiane dawcom krwi dla banku krwi. Dane mierzono przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II.

Konkretne zakresy odniesienia mogą się różnić w zależności od regionu i populacji, na podstawie której ustalono wartości. Z tego powodu laboratoria muszą ustalić własne normalne przedziały referencyjne dla podzbiorów limfocytów zidentyfikowanych przy użyciu testu KOMBITEST T Cell 4-color z lokalnej populacji zdrowych dawców ze względu na różnice w wartościach związane z wiekiem, płcią, cechami klinicznymi i pochodzeniem etnicznym.

14. Ograniczenia

Urządzenie KOMBITEST T Cell 4-color nie zostało zatwierdzone do użytku w próbkach pobranych z heparyną lub antykoagulantami kwaśnego cytrynianu dekstrozy (ACD) do oznaczania zliczeń względnych i bezwzględnych.

Urządzenie KOMBITEST T Cell 4-color nie jest przeznaczone do badań przesiewowych i/lub fenotypowania próbek białaczki i chłoniaka.

Liczby bezwzględne nie są porównywalne między laboratoriami korzystającymi z różnych urządzeń różnych producentów.

15. Bibliografia

- 1) Bensussan. A et al. Significant enlargement of a specific subset of CD3+CD8+ peripheral blood leukocytes mediating cytotoxic T-lymphocyte activity during human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 15;90(20):9427-30. doi: 10.1073/pnas.90.20.9427.
- 2) Boldt. A et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry B Clin Cytom* 2014 May;86(3):191-206. doi:10.1002/cyto.b.21162.
- 3) de Saint Basile. G et al. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1512-7. doi: 10.1172/JCI22588.
- 4) Giorgi. J V. Characterization of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Mar 20;677:417-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38803.x.
- 5) Li. Y et al. AIDS prevention and control in the Yunnan region by T cell subset assessment. *PLoS One*. 2019 Apr 18;14(4):e0214800. doi: 10.1371/journal.pone.0214800
- 6) Mason. D et al. eds.: *Leucocyte Typing VII: White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Seventh International Workshop and Conference Held in Harrogate*. United Kingdom: Oxford University Press; 2002.
- 7) McCarty. B et al. Low Peripheral T Follicular Helper Cells in Perinatally

- HIV-Infected Children Correlate With Advancing HIV Disease. *Front Immunol.* 2018 Aug 24;9:1901. doi: 10.3389/fimmu.2018.01901.
- 8) McMichael AJ. ed. *Leucocyte Typing III: 54 White Cell Differentiation Antigens.* New York. NY: Oxford University Press; 1987.
 - 9) Monafo. W J et al. A hereditary immunodeficiency characterized by CD8+ T lymphocyte deficiency and impaired lymphocyte activation. *Clin Exp Immunol.* 1992 Dec;90(3):390-3. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05856.x.
 - 10) North. M E et al. Primary defect in CD8+ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN-gamma) in CD28+ ('cytotoxic') and CD28- ('suppressor') CD8+ subsets. *Clin Exp Immunol.* 1998 Jan;111(1):70-5. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00479.x.
 - 11) Picat. M Q et al. T-cell activation discriminates subclasses of symptomatic primary humoral immunodeficiency diseases in adults. *BMC Immunol.* 2014 Mar 12;15:13. doi: 10.1186/1471-2172-15-13.
 - 12) Schlossman SF. Boumsell L. Gilks W. et al. eds.: *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.* New York. NY: Oxford University Press; 1995.
 - 13) van Dongen. J J M et al. EuroFlow-Based Flowcytometric Diagnostic Screening and Classification of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. *Front Immunol.* 2019 Jun 13;10:1271. doi: 10.3389/fimmu.2019.01271.
 - 14) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
 - 15) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
 - 16) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: *Clin Chem* 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
 - 17) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.
 - 18) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x
 - 19) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.

- 20) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem*. 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
- 21) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol*. 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
- 22) Hervé Lecoœur, Marie-Lise Gougeon, Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes, *Journal of Immunological Methods*, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 23) Bartels EM, Falbe Wätjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis*. 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
- 24) XUE Yan, XU Li, DANG Liheng, WANG Chao, CUI Yaqiong, WANG Ping, WANG Ning, ZHANG Xinjie, LIU Yang. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2022, 37(12): 1169-1173
- 25) van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, et al. (2012) Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE* 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>
- 26) Yasmine Van Caeneghem, Stijn De Munter, Paola Tieppo, Glenn Goetgeluk, Karin Weening, Greet Verstichel, Sarah Bonte, Tom Taghon, Georges Leclercq, Tessa Kerre, Reno Debets, David Vermijlen, Hinrich Abken & Bart Vandekerckhove (2017) Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities, *Oncolmunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460
- 27) Lamia Achour, Mark G. H. Scott, Hamasseh Shirvani, Alain Thuret, Georges Bismuth, Catherine Labbé-Jullié, Stefano Marullo; CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009; 113 (9): 1938–1947. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141275>
- 28) A. Stronkhorst, G. N. J. Tytgat & S. J. H. Van Deventer (1992) CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*,

27:sup194, 61-65, DOI: 10.3109/00365529209096029

- 29) Zinzani, P.L., Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 177–190 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>
- 30) Whiteman KR, Johnson HA, Mayo MF, Audette CA, Carrigan CN, LaBelle A, Zukerberg L, Lambert JM, Lutz RJ. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small cell lung cancer in human xenograft models. *MABs*. 2014 Mar-Apr;6(2):556-66. doi: 10.4161/mabs.27756. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24492307; PMCID: PMC3984343.
- 31) J Frengen, B Kierulf, R Schmid, T Lindmo, K Nustad, Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, *Clinical Chemistry*, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>.

16. Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania

Podsumowanie bezpieczeństwa i działania będzie dostępne w bazie danych Eudamed pod adresem <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Do tego czasu podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania jest dostępne na żądanie.

17. Używanie znaków towarowych stron trzecich

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, BD Multitest™ i FlowJo™ są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company. CD-Chex Plus® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Streck. Cy™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Cytiva. CyLyse™ FX, Sysmex XN-1000™ i Sysmex XF-1600™ są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Sysmex Corporation. VenturiOne® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Applied Cytometry. Infinicyt™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Cytognos S.L.

18. Historia zmian

Wersja 3. ED7734_IFU_v3

Korekta tekstu w sekcji „ Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego”.

19. Producent

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Republika Czeska

Dane kontaktowe

info@exbio.cz

technical@exbio.cz

orders@exbio.cz

www.exbio.cz

20. Upoważnieni przedstawiciele

N/A

UWAGA: każdy poważny incydent, który miał miejsce w związku z urządzeniem, należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi lokalnemu.