

exbio

CD34 QuantiFlowEx Kit 50 testů | Kat. č. ED7080



Návod k použití (CS)

Verze: ED7080_IFU_v4_CS

Datum vydání: 27-07-2023

Symbole použité k označení prostředku

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Omezení teploty
	Označení shody CE		Chránit před slunečním zářením
	Výrobce		Chránit před vlhkem
	Jedinečná identifikace prostředku (UDI)		Pozor
	Čtěte návod k použití		Koncentrovaný roztok (10x)
	Obsah postačuje pro <n> testů		Obsah
	Katalogové číslo		Označení shody UKCA
	Kód dávky		
	Použit do data		

1. Určený účel prostředku

CD34 QuantiFlowEx Kit je určen k detekci a stanovení celkového počtu životaschopných hematopoetických kmenových buněk z celkového počtu životaschopných leukocytů ve vzorcích lidské krve a tkání pomocí průtokové cytometrie.

Co se zjišťuje a/nebo měří

CD34 QuantiFlowEx Kit detekuje a měří relativní procenta a absolutní počty lidských životaschopných hematopoetických kmenových buněk (CD34+CD45dim).

Funkce prostředku

Prostředek je určen k monitorování počtu krvetvorných buněk v periferní krvi, kostní dřeni a v produktu leukaferézy.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Přesné stanovení počtu hematopoetických kmenových buněk (HSC) ve vzorcích lidské krve a tkáních nebo štěpech pro transplantaci je nezbytné pro léčbu pacienta nebo zpracování štěpu ⁽¹⁾.

Typ testu

Není automatizovaný

Kvantitativní

Typ požadovaného vzorku

Normální periferní krev, nebo mobilizovaná periferní krev, nebo produkt(y) leukaferézy, nebo kostní dřev.

Testovací populace

Není určeno pro testování konkrétní populace.

2. Účel použití

Prostředek je určen pouze pro profesionální použití v laboratoři. Prostředek není určen pro vyšetření v blízkosti pacienta nebo přímo u pacienta a není určen pro sebetestování.

Požadavky na kvalifikaci

Uživatel musí mít současné odborné znalosti v oblasti průtokové cytometrie, ovládat standardní laboratorní techniky, včetně pipetování, manipulovat bezpečně a správně se vzorky z lidského těla.

Uživatel musí splňovat normu EN ISO 15189, případně jiné národní legislativní normy.

3. Princip testu

Princip testu je založen na detekci vazby monoklonální protilátky na specifickou molekulu (antigen) exprimovanou na lidských krevních buňkách. Použité monoklonální protilátky jsou značené různými fluorochromy, které jsou excitovány laserovým paprskem z průtokového cytometru během akvizice zpracovaného krevního vzorku. Fluorescence (emise světla) zachycená z každého fluorochromu na naznačené krevní buňce je následně analyzována cytometrem. Intenzita fluorescence je přímo úměrná hustotě exprese antigenu v detekované buňce, což umožňuje rozlišení různých buněčných subpopulací.

7-AAD je barvivo, které neprochází buněčnou membránou živých buněk a umožňuje vyloučit mrtvé buňky, kde se váže na DNA. Rozdíly v intenzitě vyzářené fluorescence buněk umožňují vyloučení odumřelých buněk z další analýzy.

4. Poskytované materiály

Obsah

Prostředek CD34 QuantiFlowEx Kit vystačí na provedení 50 testů a je dodáván ve formátu:

Staining Reagent (ED7080-1; 1 lahvička) obsahující 1ml kombinaci fluorescenčně značených monoklonálních protilátek CD45 FITC a CD34 PE, naředěných na optimální koncentraci ve stabilizačním fosfátovém pufru (PBS) s obsahem 15mM azidu sodného, viz Tabulka 1.

7-AAD (ED7080-2; 1 lahvička) obsahující 1ml 7-Aminoaktinomycin D (7-AAD) barviva pro životaschopnost buněk, naředěný na optimální koncentraci ve stabilizačním fosfátovém pufru (PBS) s obsahem 15mM azidu sodného.

Lysing Solution (ED7080-3; 1 láhev) obsahující 15 ml koncentrovaného (10X) roztoku na bázi chloridu amonného bez fixačních přísad.

Složení

Tabulka 1 Popis aktivních složek

Antigen	Fluorochrom	Klon	Izotyp	Koncentrace (µg/ml)
CD45	FITC	MEM-28	IgG1	30
CD34	PE	4H11 [APG]	IgG1	35

5. Nutné, ale neposkytované materiály

Pro obě (Single i Dual platform) metody:

Testovací zkumavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

Procesní kontrolní buňky (Streck CD-Chex CD34[®], CD34 kontrola – 3 úrovně, kat. č. 213337, 213347, 213383 nebo ekvivalentní lyzovatelná buněčná kontrola s předem definovaným počtem CD34 HSC)

Pouze pro Single Platform metodu (volitelné):

Standard počtu fluorescenčních buněk

- pro použití s cytometry Becton Dickinson
 - o Zkumavky BD Trucount™
- pro použití s cytometry Beckman Coulter
 - o Beckman Coulter Flow-Count™ Fluorospheres

6. Nutná zařízení

Pro obě (Single i Dual platform) metody:

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (20 - 100 µl) pro pipetování vzorků a činidel

Dávkovač kapalin nebo pipeta s jednorázovými špičkami (2 ml) pro dávkování lyzačního roztoku

Počítací kuličky (TruCount™ Tubes (BD Biosciences; kat. č. 663028), FlowCount Fluorospheres (Beckman Coulter; kat. č. 7547053)

Vortex

Průtokový cytometr vybavený laserovým excitačním zdrojem (488 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů z fluorochromů uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v prostředí

Fluorochrom	Excitace [nm]	Emise [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
7-AAD	488	670

POZNÁMKA: Prostředek byl testován na průtokových cytometrech BD FACSCanto™ (BD Biosciences), Navios (Beckman Coulter) a XF-1600 (Sysmex).

Pouze pro Dual Platform metodu (volitelné):

Hematologický analyzátor (pro stanovení absolutního počtu buněk) schopný měřit počty bílých krvinek (WBC) a lymfocytů na μl vzorku.

7. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

Nezamrazujte.

Informace o stabilitě po prvním otevření a době použitelnosti po prvním otevření, spolu s podmínkami skladování a stabilitou pracovních roztoků (v případě potřeby) naleznete v části 10 Postup (Příprava reagií).

8. Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

Úplné informace o rizicích, která představují chemické látky a směsi obsažené v tomto výrobku a o tom, jak s nimi zacházet a jak je likvidovat, naleznete v Bezpečnostním listu (SDS), který je k dispozici na www.exbio.cz.

Biologické riziko

Lidské biologické vzorky, krevní vzorky a jakékoliv materiály, které s nimi přicházejí do kontaktu, jsou vždy považovány za infekční.

Používejte osobní ochranné a bezpečnostní pomůcky, abyste zabránili kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.

Dodržujte všechny platné zákony, předpisy a postupy pro manipulaci a likvidaci infekčních materiálů.

Projevy znehodnocení prostředku

Normální vzhled dodané reagií je čirá kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

9. Vzorek

Použijte krev nebo tkáňový materiál odebraný do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem EDTA, Heparin, nebo ACD (Acid Citrate Dextrose).

Pomocí prostředku lze analyzovat následující vzorek:

normální a mobilizovaná periferní krev, produkty leukaferézy a kostní dřev.

POZNÁMKA: Pro Dual platform analýzu stanovte absolutní počet leukocytů v odebraném vzorku krve pomocí hematologického analyzátoru. Prostředek CD34 QuantiFlowEx Kit neposkytuje absolutní počty buněk.

Vzorek krve zpracujte nejpozději do 24 hodin po odběru.

10. Postup

Příprava reagensí

Staining Reagent a 7-AAD

Není nutná žádná příprava reagensie.

Před použitím vytemperujte reagensii na pokojovou teplotu. Primární obal udržujte v suchu.

Použijte reagensii přímo z původního obalu.

Po prvním otevření si reagensie zachovává své funkční charakteristiky až do data expirace, pokud je skladována za uvedených podmínek v původní nádobě.

UPOZORNĚNÍ: Reagensii neředěte.

Lysing Solution

Naředěte koncentrovaný (10X) lyzační roztok na (1X) pracovní roztok deionizovanou vodou.

UPOZORNĚNÍ: Pracovní lyzační roztok (1X) je stabilní **pouze 1 den**. Každý den měření připravte pracovní lyzační roztok (1X) smícháním 1 dílu koncentrovaného (10X) lyzačního roztoku s 9 díly deionizované vody a uchovávejte v dávkovací kapaliny nebo uzavřené nádobě při pokojové teplotě.

Příprava nutných, ale neposkytovaných materiálů

Při přípravě a použití fluorescenčních standardů počtu buněk se řiďte pokyny výrobce.

Kontrola kvality

Použijte Streck CD-Chex CD34[®] nebo ekvivalentní kontrolní buňky jako pozitivní procedurální kontrolu, abyste ověřili správnou funkci prostředku. Streck CD-Chex CD34[®] poskytuje stanovené hodnoty pro procentuální pozitivní a absolutní počty CD34+ HSC.

Obarvěte kontrolní buňky pomocí CD34 QuantiFlowEx Kit podle postupu Značení vzorku. Ověřte, že získané výsledky (% pozitivních buněk) jsou v očekávaném rozsahu uvedeném pro použitou šarži kontrolního materiálu.

Značení vzorku – Single Platform metoda

1. Označte každou testovací zkumavku 12 x 75 mm s kulatým dnem identifikačním údajem vzorku.

POZNÁMKA: Použijte BD Trucount™ Tube jako testovací zkumavku k absolutnímu počítání CD34 kmenových buněk.

2. Pipetujte 20 µl Staining Reagent na dno testovací zkumavky 12 x 75 mm s kulatým dnem.
3. Pipetujte 20 µl 7-AAD na dno testovací zkumavky 12 x 75 mm s kulatým dnem.
4. Pipetujte 100 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno zkumavky za použití reverzní pipetovací techniky.

UPOZORNĚNÍ: Přesnost pipetování je rozhodující pro výpočet absolutního počtu CD34+ kmenových buněk. Proto by měla být použita technika reverzního pipetování s použitím pipety s automatickým vytlačováním vzduchu.

Pro reverzní pipetování vzorku zatlačte píst pipety na druhou zarážku a nasajte vzorek. Poté umístěte špičku pipety se vzorkem krve ke dnu zkumavky a stiskněte píst pipety až k první zarážce.

Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud krevní nátěr nebo kapka zůstane na stěně zkumavky, nemusí být obarvena činidlem nebo erytrocyty nemusí být zlyzovány. Výsledek testu nemusí být platný.

5. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkumavku po dobu 20-30 minut při pokojové teplotě ve tmě.
6. Přidejte 2 ml pracovního roztoku lyzačního činidla (1X) do testovací zkumavky.
7. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkumavku po dobu 10 minut při pokojové teplotě ve tmě.
8. Pokud nebyla BD Trucount™ Tube zkumavka použita, přidejte 100 µl Flow-Count™ Fluorospheres pomocí techniky reverzního pipetování. Postupujte podle pokynů výrobce.
9. Obarvený vzorek ihned měřte na průtokovém cytometru. Pokud obarvený vzorek nebude měřen okamžitě, zkumavku uzavřete uzávěrem, uchovávejte při teplotě 2-8 °C v temnu a analyzujte do 2 hodin.

UPOZORNĚNÍ: Před analýzou průtokovou cytometrií vortexujte zkumavku ke snížení agregace.

Značení vzorku – Dual Platform metoda

UPOZORNĚNÍ: Před zpracováním vzorku určete absolutní počet leukocytů v odebraném vzorku pomocí hematologického analyzátoru.

1. Označte každou testovací zkumavku 12 x 75 mm s kulatým dnem identifikačním údajem vzorku.

2. Pipetujte 20 μ l Staining Reagent na dno testovací zkušavky 12 x 75 mm s kulatým dnem.
3. Pipetujte 20 μ l 7-AAD na dno testovací zkušavky 12 x 75 mm s kulatým dnem.
4. Pipetujte 100 μ l dobře promíchaného krevního vzorku na dno zkušavky za použití reverzní pipetovací techniky.
5. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkušavku po dobu 20-30 minut při pokojové teplotě ve tmě.
6. Přidejte 2 ml pracovního roztoku lyzačního činidla (1X) do testovací zkušavky.
7. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkušavku po dobu 10 minut při pokojové teplotě ve tmě.
8. Obarvený vzorek ihned měřte na průtokovém cytometru. Pokud obarvený vzorek nebude měřen okamžitě, zkušavku uzavřete uzávěrem, uchovávejte při teplotě 2-8 °C v temnu a analyzujte do 2 hodin.

UPOZORNĚNÍ: Před analýzou průtokovou cytometrií vortexujte zkušavku pro snížení agregace.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s prostředkem CD34 QuantiFlowEx Kit musí být rutinně kalibrován pomocí fluorescenčních mikrokuliček podle pokynů výrobce cytometru, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

Při nesprávné údržbě může průtokový cytometr poskytovat falešné výsledky.

V sekci 6 Nutná zařízení jsou uvedeny potřebné specifikace cytometru pro lasery a fluorescenční detektory podle excitačních a emisních charakteristik fluorochromů.

Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.

V závislosti na vzorku zaznamenejte alespoň 300 000 – 1 000 000 událostí na zkušavku.

Vždy nahrávejte parametry rozptylu světla analyzovaných událostí: přední rozptyl světla (Forward Scatter) nahrávejte data o výšce i šířce signálu, boční rozptyl světla (Side Scatter) nahrávejte data o výšce i šířce signálu.

Pro **Single Platform** metodu nastavte omezení (threshold) pro nahrávání událostí ve fluorescenčním detektoru pro FITC namísto omezení podle velikosti událostí. Threshold v detektoru pro Forward Scatter (velikost událostí) může vyloučit z akvizice mikropartikelu fluorescenčního vnitřního standardu s následkem

nesprávného stanovení počtu procent CD34+ kmenových buněk.

Pro **Dual Platform** metodu nastavte omezení (threshold) na Forward Scatter.

Kompenzujte fluorescenční signály mezi detektory před nebo po sběru dat. Pokud jsou fluorescenční signály nesprávně kompenzovány nebo pokud jsou regiony (gates) umístěny nepřesně, mohou být data nesprávně interpretována.

POZNÁMKA: Pro přípravu kompenzační zkumavky s 7-AAD je doporučeno použít krevní vzorek s nízkou očekávanou životností buněk. Vzorek s vysokou životností buněk bude obsahovat malý počet odumřelých buněk a nízký počet pozitivních (tj. fluorescenčních v detektoru pro 7-AAD) může mít za následek nesprávné nastavení kompenzace.

Pro analýzu naměřených dat je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analýza dat obarveného vzorku CD34 QuantiFlowEx Kit

Pomocí vhodného cytometrického programu analyzujte naměřená kompenzovaná data. Pro stanovení relativního počtu živých CD34+ kmenových buněk musí být použit mezinárodně uznávaný protokol podle International Society for Hematotherapy and Graft Engineering, tzv. ISHAGE protokol (Obr. 1–5).

Na základě 5 parametrů (2 parametry rozptylu světla a 3 fluorescenční parametry) je možné identifikovat CD34+ kmenové buňky postupem kombinujícím sekvenční a logická (Boolean) ohraničení.

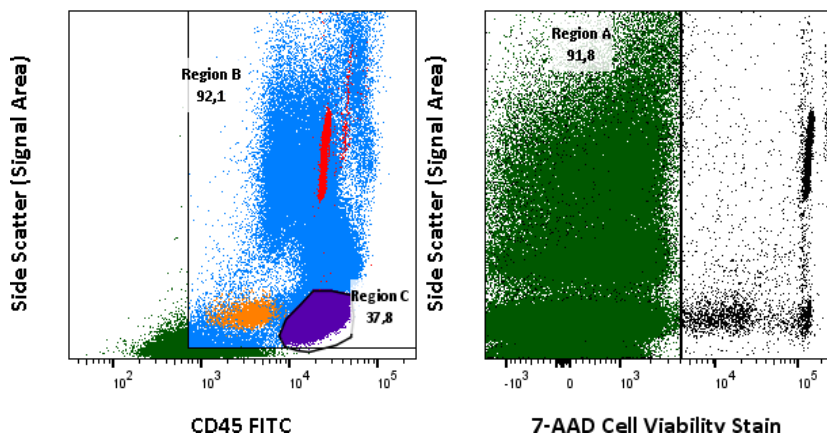
CD34+ kmenové buňky exprimují antigeny CD34 a CD45, kdy míra exprese antigenu CD45 je podobná expresi na nezralých buňkách. Intenzita fluorescence po značení je dostatečná pro detekci, avšak nižší než fluorescence např. lymfocytů. CD34+ kmenové buňky mají také charakteristický přední (FSC) i boční rozptyl (SSC) světla podobný nezralým buňkám a lymfocytům.

Obrázky 1-5 ukazují sekvenční a logické ohraničování umožňující správnou identifikaci živých CD34+ kmenových buněk pro stanovení procentuálního zastoupení buněk.

Obrázek 1 Obrázek vlevo reprezentuje všechny události z Regionů A, B, C, G (získané z Regionu F) a I.

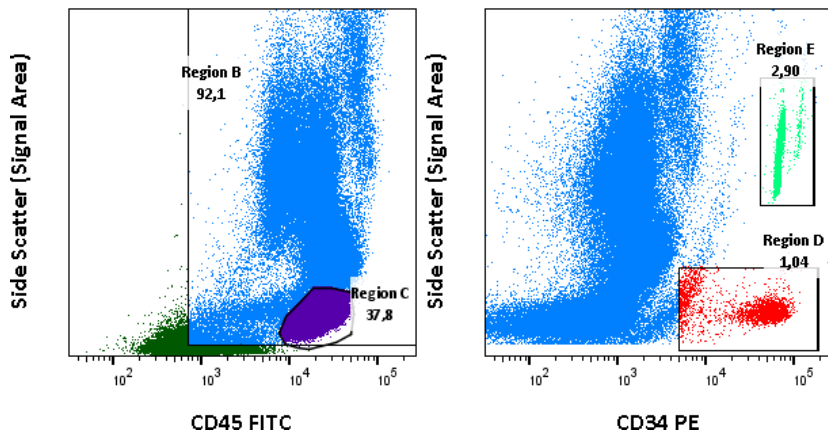
Nejprve ohraničte živé buňky (**Region A**) v dot-plot grafu výšky signálu bočního rozptylu světla (**SSC-A**) proti 7-AAD vitální barvičce, jak je to znázorněno na obrázku vpravo.

Poznámka: Při značení stabilizované (fixované) CD34 kontroly Streck CD-Chex CD34[®], je nutno upravit Region A tak, aby obsahoval všechny události, i 7-AAD pozitivní, protože buněčné membrány fixovaného krevního materiálu jsou permeabilní pro 7-AAD a všechny buňky se jeví jako pozitivní – odumřelé.



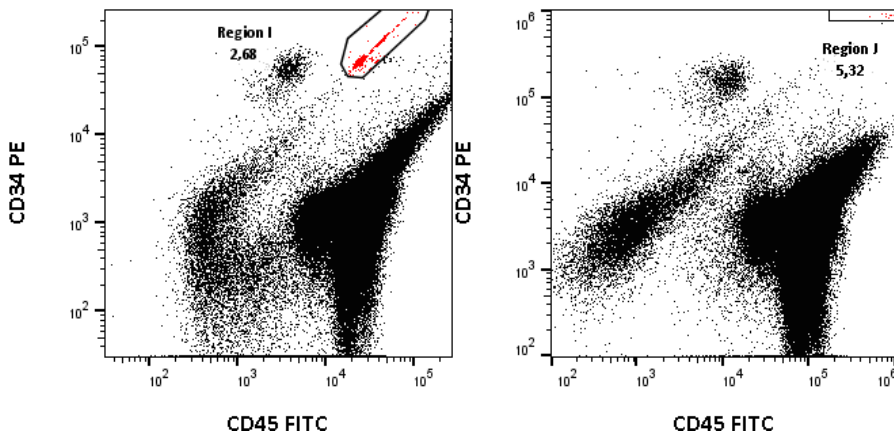
Obrázek 2 Zobrazte buňky z Regionu A v novém dot-plot grafu SSC-A proti CD45 FITC a ohraničte **leukocyty (Region B)** a **lymfocyty (Region C)**, jak je to naznačeno na obrázku vlevo.

Buňky z Regionu B zobrazte v dot-plot grafu SSC-A proti CD34 PE a ohraničte **CD34 pozitivní události (Region D)**, jak je to naznačeno na obrázku vpravo. Na obrázku vpravo jsou ještě zobrazeny **všechny události fluorescenčních mikropartikulí (Region E) z Regionu I**. Region E ukazuje optické a fluorescenční vlastnosti mikropartikulí vnitřního standardu z BD TruCount™ zkumavky.



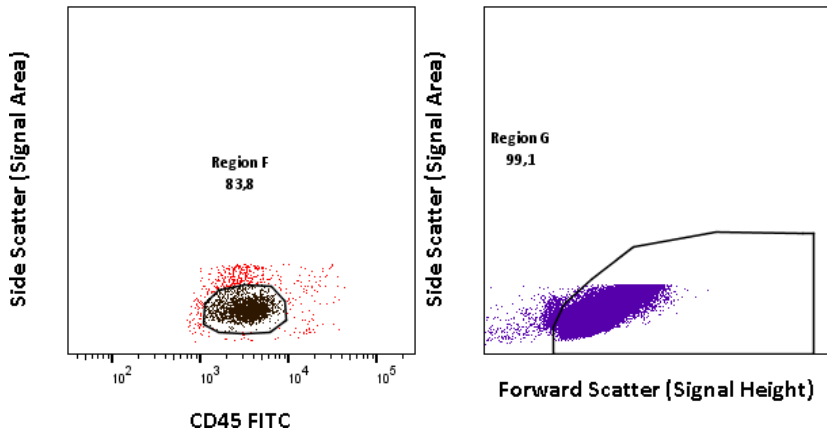
Obrázek 3 Zobrazte všechny události v grafu CD34 PE proti CD45 FITC a vytvořte ohraničení kolem událostí mikropartikulí pro fluorescenční vnitřní standard BD TruCount™ měřených pomocí cytometru BD FACSCanto™ (**Region I**) a kolem mikropartikulí Beckman Coulter Flow-Count™ měřených v cytometru Beckman Coulter Navios (**Region J**).

Poznámka 1: Optické a fluorescenční vlastnosti mikropartikulí se mohou lišit mezi různými výrobci. **Obr. 3** znázorňuje optické a fluorescenční vlastnosti mikropartikulí, které jsou součástí BD TruCount™ zkumavek a mikropartikulí z produktu Beckman Coulter Flow-Count™ Fluorospheres.

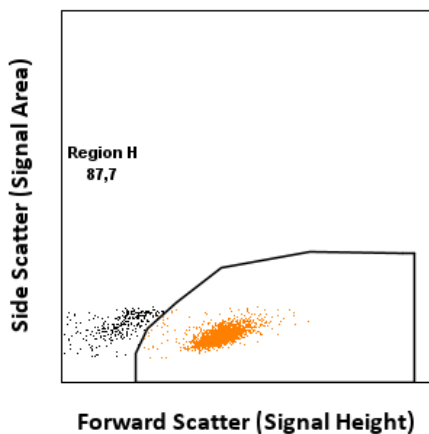


Obrázek 4 Vyčistíte CD34 pozitivní události z Regionu D umístěním **Regionu F** kolem CD45 slabě pozitivního (dim) buněčného shluku v dot-plot grafu SSC-A vs CD45 FITC s událostmi z Regionu D, jak je znázorněno na obrázku vlevo.

Zobrazte CD45+ lymfocyty (Region C) v dot-plot grafu SSC-A versus FSC-H. Umístěte nové ohraničení vymezující CD45+ lymfocyty od menších událostí a debris (**Region G**), jak je znázorněno na obrázku vpravo.



Obrázek 5 Zkopírujte **Region G** ohraničující lymfocyty z **obr. 4** (obrázek vpravo) a vložte oblast (**Region H**) do dot-plot grafu SSC-A vs FSC-H obsahujícího události z **Regionu F**, abyste odlišili shluk CD34+ kmenových buněk od menších událostí a debris. Buňky z **Regionu F** (obrázek 4) nacházející se uvnitř ohraničení **Regionu H** představují právě CD34+ kmenové buňky.



Výpočet a interpretace analytických výsledků – Single Platform metoda

Pomocí následujících výpočetních rovnic stanovte relativní (%) a absolutní počet živých CD34⁺ kmenových buněk ze všech živých leukocytů.

Stanovení absolutního počtu CD34⁺ kmenových buněk v 1 μl krevního vzorku:

$$CD34^+ abs = \frac{Region H}{Region E} \times \frac{P}{V} \times \check{R}F$$

Stanovení absolutního počtu živých leukocytů v 1 μl krevního vzorku:

$$WBC abs = \frac{Region B}{Region E} \times \frac{P}{V} \times \check{R}F$$

Stanovení procentuálního zastoupení živých CD34⁺ kmenových buněk ze všech živých leukocytů:

$$\% CD34^+ = \frac{CD34^+ Abs}{WBC Abs} \times 100$$

CD34⁺ abs absolutní počet živých CD34⁺ kmenových buněk v 1 μl krevního vzorku

WBC abs absolutní počet živých leukocytů v 1 μl krevního vzorku

% CD34⁺ procentuální zastoupení živých CD34⁺ kmenových buněk ze všech živých leukocytů

Region B počet událostí v Regionu B (leukocyty)

Region H počet událostí v regionu pro CD34⁺ kmenové buňky

Region E počet událostí v Regionu E (mikropartikule)

P počet mikropartikulí v jednom testu (počet mikropartikulí v testové zkumavce) udávaný výrobcem

V objem krevního vzorku – 100 μl

ŘF ředící faktor (ředění krevního vzorku před zpracováním). ŘF = 2 znamená, že 1 díl krevního vzorku (100 μl) byl naředěný 1 dílem PBS obsahujícím 0,5 % BSA (100 μl).

Výpočet a interpretace analytických výsledků – Dual Platform metoda

Použijte hematologický analyzátor pro stanovení počtu leukocytů v 1 μl vzorku. Postupujte podle instrukcí od výrobce hematologického analyzátoru.

Pomocí následujících výpočetních rovnic stanovte relativní (%) a absolutní počet živých CD34⁺ kmenových buněk ze všech živých leukocytů.

Stanovení absolutního počtu CD34⁺ kmenových buněk v 1 µl krevního vzorku:

$$CD34^{+} abs = \frac{Region H}{Region B} \times WBC Abs \times \check{R}F$$

Stanovení procentuálního zastoupení živých CD34⁺ kmenových buněk ze všech živých leukocytů:

$$\% CD34^{+} = \frac{Region G}{Region B} \times 100$$

CD34⁺ abs absolutní počet živých CD34⁺ kmenových buněk v 1 µl krevního vzorku

WBC abs absolutní počet živých leukocytů v 1 µl krevního vzorku stanovený hematologickým analyzátozem

% CD34⁺ procentuální zastoupení živých CD34⁺ kmenových buněk ze všech živých leukocytů

Region B počet událostí v Regionu B (leukocyty)

Region H počet událostí v regionu pro CD34⁺ kmenové buňky

ŘF ředící faktor (ředění krevního vzorku před zpracováním). ŘF = 2 znamená, že 1 díl krevního vzorku (100 µl) byl naředěný 1 dílem PBS obsahujícím 0,5 % BSA (100 µl).

11. Vlastnosti analytické funkce

Specifická

Monoklonální protilátka MEM-28 rozpoznává všechny leukocytární izoformy CD45 (receptorová protein tyrozin fosfatáza typu C). Specifická protilátky byla potvrzena workshopem HLDA (dílna HLDA III ⁽²⁾).

Monoklonální protilátka 4H11[APG] rozpoznává epitop třídy III lidského CD34 antigenu (mukosialin). Specifická protilátky byla potvrzena workshopem HLDA (dílna HLDA VI ⁽³⁾).

Přesnost

Přesnost prostředku byla stanovena porovnáním prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s podobným výrobkem dostupným na trhu (BD Stem Cell Enumeration Kit, kat. č. 344563) paralelním barvením 34 krevních a tkáňových vzorků analyzovaných cytometry BD FACSLyric™ a Sysmex XF-1600 (tabulka 3, 4) a také porovnáním s jinými dobře dokumentovanými akreditovanými metodami paralelním barvením 75 krevních a tkáňových vzorků analyzovaných cytometry BD FACSLyric™ nebo Beckman Coulter Navios (tabulka 5, 6, 7).

Parametry lineární regresní analýzy jsou uvedeny v tabulce 3 - 7.

Tabulka 3 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky dárců (srovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s IVD produktem BD Stem Cell Enumeration Kit. (kat. č. 344563)) analyzovaným na průtokovém cytometru BD FACSLytic™.

Srovnání s BD Stem Cell Enumeration Kit						
BD FACSLytic™						
Cílová populace	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	r ²	Rozsah
CD34 ⁺ CD45dim	%	34	0,9313	0,0773	0,9602	0,12 - 1,22
	buněk/μl	34	1,0152	-8,2612	0,9977	6 - 2137

Tabulka 4 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky dárců (srovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s IVD produktem BD Stem Cell Enumeration Kit. (kat. č. 344563)) analyzovaným na průtokovém cytometru Sysmex XF-1600.

Srovnání s BD Stem Cell Enumeration Kit						
Sysmex XF-1600						
Cílová populace	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	r ²	Rozsah
CD34 ⁺ CD45dim	%	34	0,9600	0,0473	0,9572	0,22 - 1,28
	buněk/μl	34	1,0233	-2,3868	0,9977	22 - 5035

Tabulka 5 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky v periferní krvi (srovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s akreditovanou klinickou laboratorní „in house“ metodou – směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek od různých výrobců společně s lyzačním činidlem založeným na chloridu amonném analyzovaném na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II nebo Beckman Coulter Navios.

Srovnání s akreditovanou metodou						
Periferní krev						
Cílová populace	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	r ²	Rozsah
CD34 ⁺ CD45dim	%	30	0,9743	-0,0005	0,9967	0,02 - 2,22
	buněk/μl	30	0,9757	-0,4106	0,9947	0,24 - 468

Tabulka 6 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky v produktu leukaferézy (srovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s akreditovanou klinickou laboratorní „in house“ metodou – směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek od různých výrobců společně s lyzačním činidlem založeným na chloridu amonném analyzovaném na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II nebo Beckman Coulter Navios.

Srovnání s akreditovanou metodou						
Leukaferézni produkt (PBSC)						
Cílová populace	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	r ²	Rozsah
CD34 ⁺ CD45dim	%	25	0,9999	-0,0061	0,9925	0,81 - 10,56
	buněk/μl	25	0,9844	45,762	0,9918	1392 - 17497

Tabulka 7 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky v kostní dřeni (srovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s akreditovanou klinickou laboratorní „in house“ metodou – směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek od různých výrobců společně s lyzačním činidlem založeným na chloridu amonném analyzovaném na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II nebo Beckman Coulter Navios.

Srovnání s akreditovanou metodou						
Kostní dřeň						
Cílová populace	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	r ²	Rozsah
CD34 ⁺ CD45dim	%	20	0,9385	0,0467	0,9954	0,24 - 3,14
	buněk/μl	20	1,028	-4,1351	0,9991	47 - 1708

Linearita

Linearita metody byla ověřena na vzorku krve obohaceného o leukocyty (buffy coat) smíchaného s ředěnými (11 sériových ředění) CD34+ buňkami (KG-1) měřeným během 1 dne 1 operátorem na cytometru BD FACSCanto™.

Pro vyhodnocení očekávaných a naměřených hodnot v každém bodě ředění byla použita lineární regresní funkce. V tabulce 8 je uveden rozsah koncentrací CD34+ kmenových buněk, ve kterých bylo jejich početní zastoupení v linearitě.

Tabulka 8 Linearita prostředku analyzovaná pomocí BD FACSCanto™

BD FACSCanto™					
Cílová populace	Jednotky	Směrnice	Intercept	r ²	Rozsah
CD34 ⁺ CD45dim	buněk/μl	1,0648	4,4804	1,0000	3,64 - 2862

Opakovatelnost

Opakovatelnost prostředku byla měřena na deseti vzorcích krve v hexaplikátech. Vzorky byly analyzovány průtokovými cytometry BD FACSLyric™ a Sysmex XF-1600 flow cytometer. Variační koeficienty (CV) jsou uvedeny v tabulkách níže (Tabulka 9 a 10).

Tabulka 9 Opakovatelnost prostředku analyzovaná pomocí BD FACSLyric™

BD FACSLyric™					
Cílová populace	Jednotky	n	Průměr	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	1,21	0,051	4,31
	buněk/μl	10	334	109	33

Tabulka 10 Opakovatelnost prostředku analyzovaná pomocí Sysmex XF-1600

Sysmex XF-1600					
Cílová populace	Jednotky	n	Průměr	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	1,6	0,103	4,67
	buněk/μl	10	448	166	37

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost prostředku byla měřena na stabilizovaném krevním vzorku (CD-Chex CD34, Level 3) při stejných podmínkách po dobu 15 dnů. Vzorky byly analyzovány pomocí průtokových cytometrů BD FACSLyric™ a Sysmex XF-1600. Variační koeficienty (CV) jsou uvedeny v tabulkách níže (Tabulka 11 a 12).

Tabulka 11 Reprodukovatelnost prostředku analyzovaná pomocí BD FACSLyric™

Reprodukovatelnost - BD FACSLyric™				
Cílová populace	Očekávaná průměrná hodnota (%)	Naměřená průměrná hodnota (%)	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	1,65	1,67	0,0004	2,42

Tabulka 12 Reprodukovatelnost prostředku analyzovaná pomocí Sysmex XF-1600

Reprodukovatelnost - Sysmex XF-1600				
Cílová populace	Očekávaná průměrná hodnota (%)	Naměřená průměrná hodnota (%)	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	1,65	1,66	0,0004	2,66

12. Vlastnosti klinické funkce

Klinická data byla shromážděna na klinickém pracovišti. Vlastnosti klinické funkce prostředku ED7080 byly stanoveny porovnáním CD34 QuantiflowEx Kit s akreditovanou „in-house“ laboratorní metodou. Bylo otestováno 75 vzorků, včetně periferní krve, produktů leukaferézy a vzorků kostní dřevě. Na základě získaných dat byla zjištěna 100% shoda mezi metodami v následné péči o pacienta.

13. Očekávané hodnoty

Prostředek je určen k detekci a počítání celkových životaschopných krvetvorných buněk a samo o sobě nestanoví žádnou diagnózu. Posouzení kvality vzorku závisí na zamýšlené aplikaci.

Pro tři typy vzorků jsou rozsahy hodnot získané z klinické studie uvedeny v kapitole 11 (Vlastnosti analytické funkce), část Přesnost.

14. Rušivé látky a omezení

Prostředek není určen k identifikaci a počítání mezenchymálních, nervových, epiteliálních a kožních kmenových buněk.

15. Odkazy

- 1) Sutherland DR, et. al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother.* 1996 Jun;5(3):213-26. doi: 10.1089/scd.1.1996.5.213.
- 2) McMichael AJ, et al. eds. Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- 3) Kishimoto T, et al. eds. Leucocyte Typing VI. New York: Garland Publishing, Inc., 1997.
- 4) Whitby A, et. al. ISHAGE protocol: are we doing it correctly? *Cytometry B Clin Cytom.* 2012 Jan;82(1):9-17. doi: 10.1002/cyto.b.20612. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21915992.

16. Ochranné známky

BD FACSCanto™, Trucount™, FlowJo™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson a Company, CD-Chex CD34® je registrovaná ochranná známka firmy Streck, Navios™, Flow-Count™ Fluorospheres je registrovaná ochranná známka firmy Beckman Coulter.

17. Historie revizí

Verze 4, ED7080_IFU_v4

Byla vymazána pupečnicková krev z kapitoly Funkce prostředku, v kapitolách Nutné, ale neposkytované materiály a Nutná zařízení (kapitoly 5 a 6) bylo provedeno rozdělení pro single- a dual-platform metodu, oprava chyb v sekci Analýza dat, změny v kapitolách 11., 12. a 13. (doplnění analytických a klinických dat), doplněna citace.

Byla opravena strategie ohraničení CD34 kmenových buněk. Právě CD34+ kmenové buňky (Region H) byly plně specifikovány.

Strana 15: Oprava vzorce pro výpočet absolutního počtu.

18. Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

Kontaktní informace

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

19. Zplnomocněný zástupce

N/A

POZNÁMKA: Jakákoli vážná událost, která se vyskytla v souvislosti s prostředkem, musí být oznámena výrobci a místnímu příslušnému úřadu.