

exbio

KOMBITEST B/NK Cell 4-color

50 testów | Nr kat. ED7735



Instrukcja użycia (PL)

Wersja: ED7735_IFU_v2_PL

Data wydania: 03.12.2024 r.

Symbole stosowane w oznakowaniu urządzeń

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

1. Przeznaczenie

KOMBITEST B/NK 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 B/NK Cell 4-color wykrywa i mierzy względne wartości procentowe i bezwzględne liczby ludzkich komórek T (CD3+), komórek B (CD3-CD19+) i komórek NK (CD3-CD16+56+).

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

Częstotliwości populacji limfocytów mierzone przez urządzenie mogą być zależne od różnych stanów patologicznych i są przydatne przy ocenie:

- Limfocytów T CD3+ w zakażeniach wirusowych i dziedzicznych niedoborach odporności ^(1, 7)
- Limfocytów B CD3-/CD19+ w chorobach autoimmunologicznych ⁽²⁾
- Komórek NK CD3-/CD16+56+ w odporności wrodzonej i w defekcie immunologicznym ^(4, 5)

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 wzbudzone 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 B/NK 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 / CD16 PE + CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC, 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
CD16	PE	3G8	IgG1	1,5
CD56	PE	LT56	IgG2a	1,5
CD19	APC	LT19	IgG1	2
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 osprzęt

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 Widmowa charakterystyka zastosowania fluorochromów 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.

Zagrozenie 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. Samo urządzenie KOMBITEST B/NK Cell 4-color nie zapewnia zliczenia bezwzględnej liczby komórek.

Próbka krwi z liczbą WBC przekraczającą 40×10^3 komórek/ μl 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.	8, 9, 10
Bilirubina (żółta) (niesprzężona)	Bilirubina może zwiększać tło fluorescencji komórek ze względu na wysoką	11, 12, 13

	autofluorescencję.	
Pozostałości komórek (po lizie)	Szczałki komórek mogą powodować błędy w liczeniu komórek i wyczerpanie przeciwciał w urządzeniu.	14, 15
Erytrocyty	Niewystarczająca liza, obecność czerwonych krwinek w próbce może mieć wpływ na liczbę komórek.	16
Hemoglobina	Zhemolizowane próbki mogą dawać niewiarygodne wyniki.	17
Ludzkie przeciwciała przeciw mysim	Mogą mieć wpływ na funkcjonowanie urządzenia (zdolność do wiązania się z antygenami powierzchniowymi komórek)	18, 19, 20, 21, 22, 23
Immunoglobuliny	Nie można myć metodą pojedynczej platformy, może to mieć wpływ na liczbę podzbiorów limfocytów.	24
Czynniki reumatoidalne	Obecność RF zakłóca MIA (multipleksowe testy immunologiczne).	25
Trójglicerydy	Wysoki poziom lipidów w krążeniu może wpływać na analizę cytometrii przepływowej niektórych populacji komórek krwi.	26

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 komórki kontrolne przy użyciu odczynnika KOMBITEST B/NK Cell 4-color zgodnie z obróbką próbki określoną 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. Nanieść 20 µl odczynnika KOMBITEST B/NK 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 na boku probówki pozostanie rozmaz krwi lub kropla, 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 wybrany do współpracy z urządzeniem KOMBITEST B/NK Cell 4-color należy rutynowo kalibrować przy użyciu mikrokulek fluorescencyjnych, aby zapewnić stabilną czułość detektorów zgodnie z zaleceniami 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 dodatkowo zdarzenia są dociskane do prawej osi.

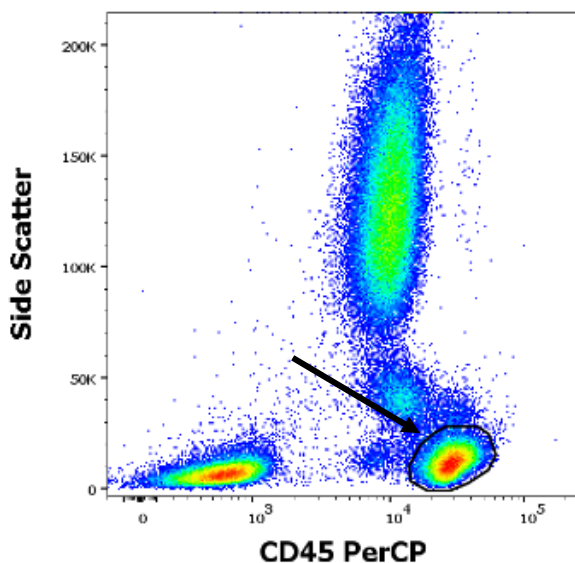
Kompensacja sygnałów fluorescencji między detektorami przed lub po akwizycji danych. Dane mogą być nieprawidłowo interpretowane, jeśli sygnały fluorescencyjne są niewłaściwie kompensowane lub jeśli bramki są ustawione niedokładnie.

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 B/NK Cell 4-color

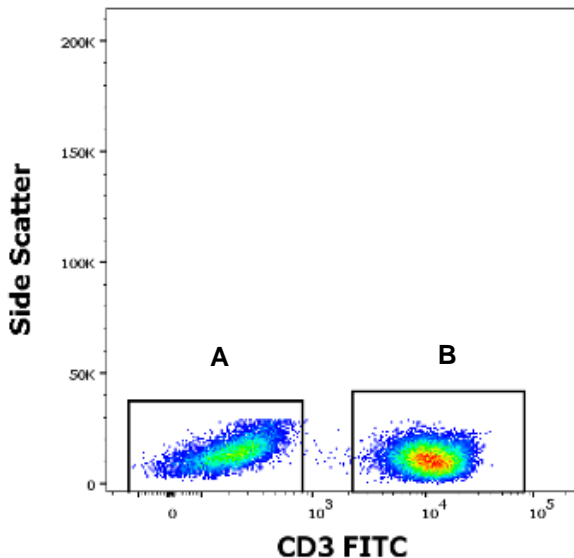
Zwizualizować skompensowane dane na wykresie rozproszenia bocznego (SSC) w porównaniu z CD45 PerCP. Ustawić bramkę dla populacji limfocytów CD45+, jak pokazano na rysunku 1.

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



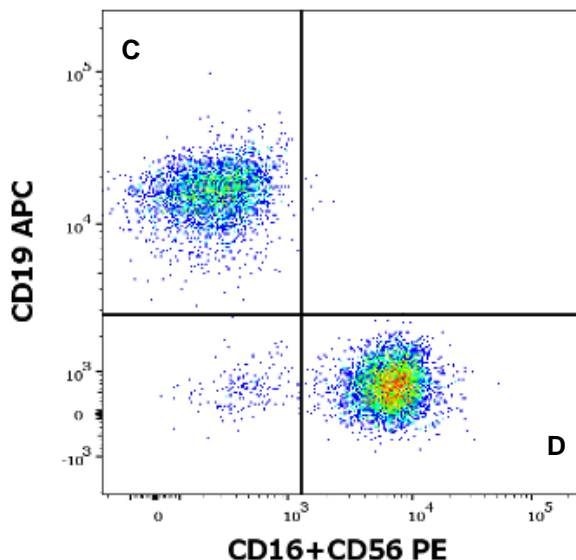
Wykreślić bramkowane limfocyty CD45+ na wykresie rozproszenia bocznego (SSC) względem CD3 FITC, jak pokazano na rysunku 2. Oddzielić limfocyty CD3+ i CD3- za pomocą odpowiednich bramek. Obliczyć procent limfocytów T (CD3+; region B na rysunku 2) ze wszystkich limfocytów.

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



Wykreślić bramkowane limfocyty CD3- (region A na rysunku 2) jako CD19 APC w porównaniu z CD16+CD56 PE, jak pokazano na rysunku 3. Ustawić odpowiednie bramki i obliczyć procent komórek B (CD16-CD56-CD19+; region C na rysunku 3) i komórek NK (CD16+CD56+CD19-; region D na rysunku 3) ze wszystkich limfocytów.

Rysunek 3 Limfocyty CD3- na wykresie punktowym CD19 APC vs. CD16+CD56 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.

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

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 3G8 rozpoznaje ludzki antygen CD16 (receptor Fc-gamma immunoglobuliny typu III o niskim powinowactwie). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztat HLDA (warsztaty HLDA V ⁽⁶⁾).

Przeciwciało LT56 rozpoznaje izoformę leukocytów ludzkiego antygeny CD56 (cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych 1). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA X).

Przeciwciało LT19 rozpoznaje ludzki antygen CD19 (transbłonowa glikoproteina CD19 komórek B). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA X).

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 ⁽³⁾).

Dokładność

Dokładność

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

Dokładność tej metody została potwierdzona równoległym barwieniem u 81 pacjentów (patrz tabela 5), u których podejrzewano patologiczne zaburzenia układu odpornościowego. Parametry analizy regresji liniowej podano w tabelach 4 i 5.

Tabela 4 Analiza regresji liniowej dla podzbiorów limfocytów u zdrowych dawców (porównanie urządzenia KOMBITEST B/NK Cell 4-color z produktem IVD KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, Cat. No. ED7733))

Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwył	R ²
CD3+	%	60	0.994	0.003	1,00
	komórek/ μ l	60	0.992	9.958	1,00
CD3-CD16+CD56+	%	60	0.995	0.001	1,00
	komórek/ μ l	60	1.010	-2.796	1,00
CD3-CD19+	%	60	1.003	0.002	1,00
	komórek/ μ l	60	1.003	3.669	0,99

n = liczba próbek krwi

Tabela 5 Analiza regresji liniowej dla podzbiorów limfocytów u pacjentów z podejrzeniem stanów patologicznych układu odpornościowego (porównanie urządzenia KOMBITEST B/NK Cell 4-color z systemem do cytometrii przepływowej AQUIOS CL – Beckman Coulter, Inc.)

Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwył	R ²
CD3+	%	81	1,042	-2,976	0,97
	komórek/ μ l	81	1,005	-0,010	1,00
CD3-CD16+CD56+	%	81	1,061	-0,626	0,98
	komórek/ μ l	81	1,078	-0,017	0,99
CD3-CD19+	%	81	1,023	-0,163	0,99
	komórek/ μ l	81	1,032	-0,006	1,00

n = liczba próbek krwi

Liniowość

Liniowość metody zweryfikowano na 10 seryjnych rozcieńczeniach próbki krwi wzbogaconej w leukocyty (kożuszek leukocyтары). Próbki komórek barwiono za pomocą KOMBITEST B/NK Cell 4-color w heksaplikacjach. Próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II i cytometru przepływowego Beckman Coulter DxFLEx. Zaobserwowano, że zmierzone dane dla wskazanych podzbiorów limfocytów są liniowe w całym zakresie limfocytów 368–10634 komórek/ μ l przy użyciu BD FACSCanto™ II i 328–9061 komórek/ μ l przy użyciu Beckman Coulter DxFLEx. Podzbiory komórek mieściły się w zakresach podanych w tabelach 6 i 7.

Tabela 6 Liniowe zakresy podzbiorów limfocytów analizowane przez BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	
Podzbiór limfocytów	Zakres (komórki/ μ l)
CD3+	227–6163
CD3-CD16+CD56+	59–1609
CD3-CD19+	34–912

Tabela 7 Liniowe zakresy podzbiorów limfocytów analizowane przez Beckman Coulter DxFLEx

Beckman Coulter DxFLEx	
Podzbiór limfocytów	Zakres (komórki/ μ l)
CD3+	217–6051
CD3-CD16+CD56+	69–1669
CD3-CD19+	33–889

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 8–9).

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 8–9).

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

Tabela 8 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	0,12 (0,04)	1,12	8
CD3-CD16+CD56+	3	1,2 (0,4)	4,2	21
CD3-CD19+	1	1,2 (0,4)	2,2	34

Tabela 9 Granice wykrywalności i oznaczalności na Beckman Coulter DxFLEx

Beckman Coulter DxFLEx				
Podzbiór limfocytów	Najniższa niezerowa liczba komórek (komórki na μl)	$3 \times SD$ (SD)	LOD (komórki na μl)	LOQ (komórki na μl)
CD3+	1	0,3 (0,1)	1,3	25
CD3-CD16+CD56+	1	0,3 (0,1)	1,3	23
CD3-CD19+	1	0,6 (0,2)	1,6	33

Powtarzalność

Powtarzalność testu mierzono na dziesięciu próbkach krwi w heksaplikacjach. Próbkę analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II i cytometru przepływowego Beckman Coulter DxFLEx. Współczynniki zmienności (CV) przedstawiono w poniższych tabelach (tabela 10 i 11).

Tabela 10 Powtarzalność urządzenia na BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Średnio	SD	%CV
CD3+	%	10	66,47	0,29	0,44
	komórek/ μ l	10	1362	6,19	
CD3-CD16+CD56+	%	10	18,66	0,21	1,26
	komórek/ μ l	10	374	4,36	
CD3-CD19+	%	10	13,69	0,20	1,57
	komórek/ μ l	10	284	4,35	

Tabela 11 Powtarzalność urządzenia na Beckman Coulter DxFLEx

Beckman Coulter DxFLEx					
Podzbiór limfocytów	Jednostka	n	Średnio	SD	%CV
CD3+	%	10	65,99	0,59	0,92
	komórek/ μ l	10	1352	11,67	
CD3-CD16+CD56+	%	10	19,08	0,44	2,44
	komórek/ μ l	10	382	8,62	
CD3-CD19+	%	10	13,55	0,34	2,59
	komórek/ μ l	10	281	6,73	

Odtwarzalność

Odtwarzalność testu mierzono na 2 ustabilizowanych próbkach krwi (CD-Chex Plus® i CD-Chex Plus® CD4 Low) w tych samych warunkach przez 15 dni przy użyciu 3 partii Urządzenia (5 dni każda). Próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II i cytometru przepływowego Beckman Coulter DxFLEx. Współczynniki zmienności (CV) podano w poniższych tabelach (tabela 12 i 13).

Tabela 12 Odtwarzalność urządzenia na BD FACSCanto™ II

Podzbiór limfocytów	Materiał	Jednostka	Średnio	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	77,39	0,24	0,31
		komórek/ μ l	1909	5,97	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	61,38	0,55	0,90
		komórek/ μ l	891	8,04	
CD3-CD16+CD56+	CD-Chex Plus®	%	10,57	0,19	1,84
		komórek/ μ l	261	4,81	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19,28	0,46	2,37
		komórek/ μ l	280	6,64	
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11,20	0,13	1,13
		komórek/ μ l	276	3,12	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	17,95	0,38	2,13
		komórek/ μ l	261	5,55	

Tabela 13 Odtwarzalność urządzenia na Beckman Coulter DxFLEx

Podzbiór limfocytów	Materiał	Jednostka	Średnio	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76,77	0,27	0,36
		komórek/ μ l	1894	6,77	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60,53	0,38	0,62
		komórek/ μ l	878	5,45	
CD3-CD16+ CD56+	CD-Chex Plus®	%	10,83	0,21	1,96
		komórek/ μ l	267	5,23	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19,54	0,31	1,61
		komórek/ μ l	284	4,55	
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11,36	0,23	2,03
		komórek/ μ l	280	5,68	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	18,23	0,43	2,38
		komórek/ μ l	265	6,31	

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
Systemx XF-1600™	IPU Software – wersja 0(0.09-00)

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

Systemx 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 pierwotnym niedoborem odporności

Dane kliniczne zebrano w ośrodku klinicznym od 30 pacjentów z podejrzeniem pospolitego zmiennego niedoboru odporności (CVID). Skuteczność kliniczną urządzenia ED7735 określono jako porównanie urządzenia KOMBITEST B/NK Cell 4-color z użyciem roztworu do lizy erytrocytów EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., nr kat. ED7066) z akredytowaną metodą laboratorium klinicznego (System cytometrii przepływowej AQUIOS CL — Beckman Coulter, Inc.).

Wyniki oceny statusu immunologicznego pacjentów oceniano pod kątem niedoboru odporności (tabela 14).

Tabela 14 Skuteczność kliniczna urządzenia KOMBITEST B/NK Cell 4-color – pacjenci z CVID

		Stan odporności oceniany akredytowaną metodą laboratorium klinicznego	
		Niedobór odporności	Normalna kondycja
Stan odporności oceniany urządzeniem KOMBITEST B/NK Cell 4-color	Niedobór odporności	23 pacjentów	0 pacjentów
	Normalna kondycja	0 pacjentów	7 pacjentów

13. Oczekiwane wartości

Interwał odniesienia

Tabela 15 Interwały odniesienia zdrowych dawców krwi mierzone na urządzeniu BD FACSCanto™ II

Podzbiór limfocytów	n	Jednostka	Zakres		Mediana
			Min	Maks	
CD3+	60	%	57,8	87,2	73,0
	60	komórek/ μ l	766	2105	1405
CD3-CD16+ CD56+	60	%	4,3	31,4	14,7
	60	komórek/ μ l	82	595	281
CD3-CD19+	60	%	2,8	23,5	10,1
	60	komórek/ μ l	61	630	184

Przedziały referencyjne podane w tabeli 15 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 za pomocą testu KOMBITEST B/NK Cell 4-color na podstawie lokalnej populacji zdrowych dawców ze względu na różnice w wartościach związane z wiekiem, płcią, cechami klinicznymi i pochodzeniem etnicznym.

14. Ograniczenia

Urządzenie KOMBITEST B/NK Cell 4-color nie zostało uprawnione do stosowania w próbkach pobranych z heparyną lub antykoagulantami kwaśnego cytrynianu dekstrozy (ACD) do oznaczania zliczeń względnych i bezwzględnych.

Urządzenie KOMBITEST B/NK 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) 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.
- 2) Kucuksezer, U C et al. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2021 Feb 25;12:622306. doi: 10.3389/fimmu.2021.622306.
- 3) McMichael AJ, ed. Leucocyte Typing III: 54 White Cell Differentiation Antigens. New York, NY: Oxford University Press; 1987.
- 4) Orange, J S. Natural killer cell deficiency. J Allergy Clin Immunol. 2013 Sep;132(3):515-525. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.020.
- 5) Orange, J S. How I Manage Natural Killer Cell Deficiency. J Clin Immunol. 2020 Jan;40(1):13-23. doi: 10.1007/s10875-019-00711-7.
- 6) Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds.: Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. New York, NY: Oxford University Press; 1995.
- 7) 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.
- 8) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. Clin Biochem Rev. 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
- 9) Selby C. Interference in immunoassay. Ann Clin Biochem. 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
- 10) 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>.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.

- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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).
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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, *Oncol Immunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460.
- 20) 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>.
- 21) 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.
- 22) 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>.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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>.

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. 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 2, ED7735_IFU_v2

- 1) Dodanie numeru identyfikacyjnego jednostki notyfikowanej.
- 2) Korekta tekstu w części „Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego”.
- 3) Dodano interferencję endogeniczną i egzogeniczną.
- 4) Dodanie rozdziału Dokładność.
- 5) Wstawić nową sekcję: Granica wykrywalności / Granica oznaczalności / Punkt odcięcia analizy
- 5) Artykuł 13. Wartości oczekiwane – drobne poprawki tekstu.
- 6) Aktualizacja odniesień.
- 7) Dodano nowy rozdział numer 16. Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania.

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.