

exbio

CD34 QuantiFlowEx Kit

50 testů | Kat. č. ED7080

IVD **CE** 2265

Návod k použití (CS)

Verze: ED7080_IFU_v5_CS

Datum vydání: 24-10-2024

Symboły použité k označení prostředku

IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Omezení teploty
CE 2265	Označení shody CE ID číslo notifikované osoby		Chránit před slunečním zářením
	Výrobce		Chránit před vlhkem
UDI	Jedinečná identifikace prostředku (UDI)		Pozor
	Čtěte návod k použití	CONC 10x	Koncentrovaný roztok (10x)
	Obsah postačuje pro <n> testů	CONTENTS	Obsah
REF	Katalogové číslo	UKCA	Označení shody UKCA
LOT	Kód dávky		
	Použít 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 produktech 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 dřeň.

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 vyzáření 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

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™ II a BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios (Beckman Coulter) a XF-1600™ (Sysmex).

Pouze pro Dual Platform metodu

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 reagentů).

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 reagentie 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.

Endogenní interference

Na základě výzkumu vědecké literatury jsou zdroje endogenní interference identifikovány v tabulce 3.

Tabulka 3 Endogenní interference prostředku

Endogenní interference	Vliv	Odkazy
Albumin	Albumin může interferovat ve vysokých koncentracích díky své schopnosti vázat a také uvolňovat velká množství ligandů.	2, 3, 4
Bilirubin (žloutenka) (nekonjugovaný)	Bilirubin může zvýšit fluorescenční pozadí buněk díky své vysoké autofluorescenci.	5, 6, 7
Zbytky buněk (po lýze)	Zbytky buněk mohou poskytovat nepřesné počty buněk a vyčerpat protilátky v zařízení.	8, 9
Erytrocyty	Nedostatečná lýze, červené krvinky přítomné ve vzorku mohou vést k chybnému počítání buněk.	6
Hemoglobin	Hemolyzované vzorky mohou poskytovat chybné výsledky.	10
Lidské anti-myší protilátky	Léčba monoklonálními protilátkami může vést k chybným výsledkům (schopnost vázat se na antigeny buněčného povrchu).	11, 12, 13, 14, 15, 16
Imunoglobuliny	Nelze odmyt a mohou vést k chybnému počtu podskupin lymfocytů.	8
Revmatoidní faktory	Přítomnost RF interferuje s MIA (multiplexní imunoanalýzy).	17
Triglyceridy	Vysoké cirkulující hladiny lipidů mohou ovlivnit analýzu průtokovou cytometrií určitých populací krevních buněk.	18

Exogenní interference

Vzorek starší než 24 hodin může poskytovat chybné výsledky.

Chlazený vzorek může poskytovat chybné výsledky.

Nesprávná příprava roztoku pro lyzu erytrocytů může vést k chybným výsledkům.

Dodržujte pokyny výrobce pro použití roztoku pro lyzu erytrocytů.

10. Postup

Příprava reagensí

Staining Reagent a 7-AAD

Není nutná žádná příprava reagensie.

Před použitím vytemperujte reagensii na laboratorní 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 neředte.

Lysing Solution

Naředte 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 kapalině nebo uzavřené nádobě při laboratorní 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 s kulatým dnem.
3. Pipetujte 20 µl 7-AAD na dno testovací zkumavky 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 laboratorní 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 laboratorní 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 µl Staining Reagent na dno testovací zkumavky s kulatým dnem.
3. Pipetujte 20 µl 7-AAD na dno testovací zkumavky s kulatým dnem.
4. Pipetujte 100 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno zkumavky za použití reverzní pipetovací techniky.
5. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkumavku po dobu 20-30 minut při laboratorní 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 laboratorní teplotě ve tmě.
8. 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 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 zkumavku.

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) ohrazení.

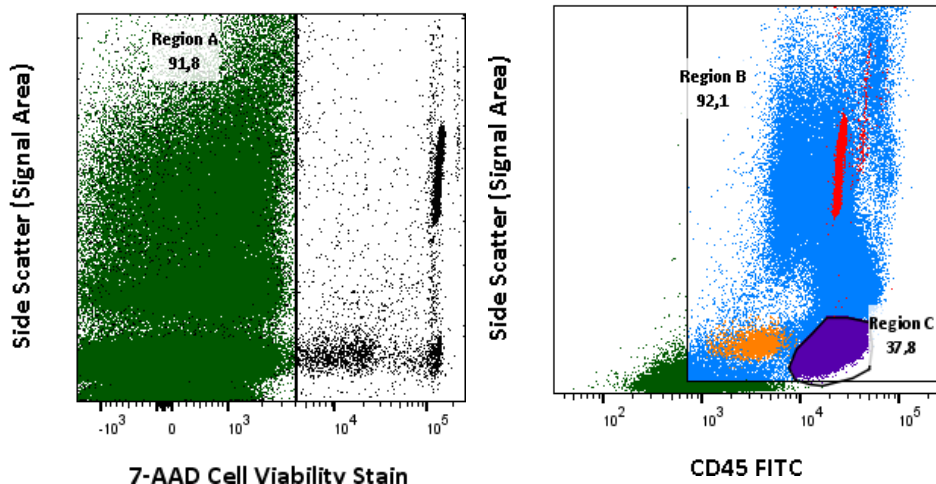
CD34+ kmenové buňky exprimují antigeny CD34 a CD45, kdy míra exprese antigenu CD45 je podobná expresi na nezralých buňkách. Intenzita fluorescence po značení je dostatečná pro detekci, avšak nižší než fluorescence např. lymfocytů. CD34+ kmenové buňky mají také charakteristický přední (FSC) i boční rozptyl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

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 vlevo.

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 1 Obrázek vlevo představuje výběr životaschopné populace. Obrázek vpravo představuje všechny ohraničení z oblastí A, B, C, G (odvozené z Regionu F) a I.

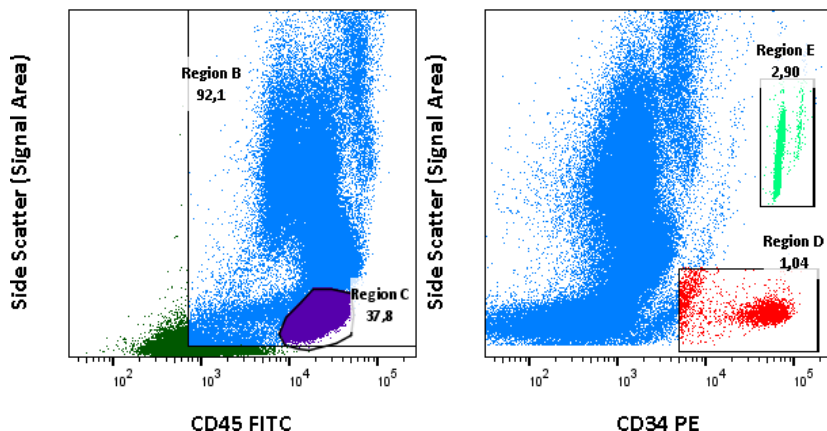


Zobrazte buňky z oblasti A na bodovém grafu SSC-A vs. CD45 FITC a umístěte ohraničení kolem **leukocytů (Region B)** a ohraničení kolem **lymfocytů (Region C)**.

Přenešte buňky z oblasti B na bodovou plochu SSC-A vs. CD34 PE a umístěte ohraničení kolem **CD34 pozitivních událostí (Region D)**.

Obrázek vpravo zobrazuje **všechny události** včetně fluorescenčních mikročastic z **oblasti I** znázorněné v **oblasti E**. **Region E** označuje optické a fluorescenční vlastnosti fluorescenčního standardu pro počítání mikročastic přítomného ve zkumavce BD TruCount™ (pouze pro metodu s jednou platformou).

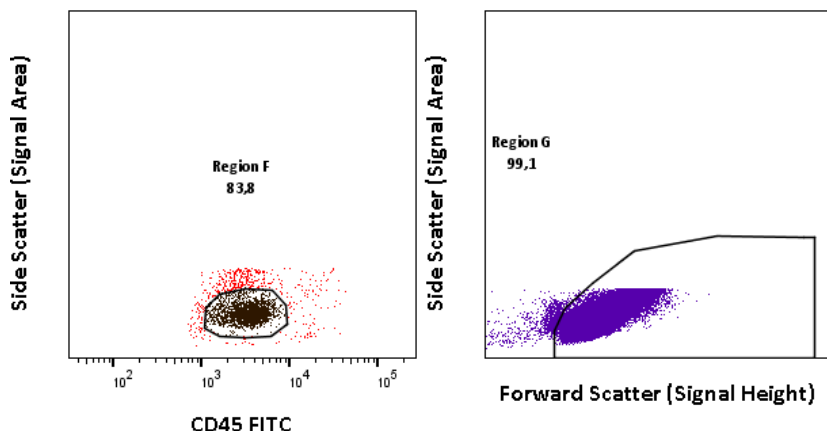
Obrázek 2 Obrázek vlevo představuje výběr životaschopné populace leukocytů (Region B) a lymfocytů (Region C). Obrázek vpravo zobrazuje životaschopné CD34 pozitivní události (Region D) vybrané z leukocytů (Region B). Pro metodu Single platform lze kolem fluorescenčních kuliček umístit ohraničení (Region E).



Vyčistěte CD34 pozitivní události z oblasti D umístěním **Regionu F** kolem shluku CD45 dim-pozitivních buněk do SSC-A vs. CD45 FITC dot-plotu s událostmi z oblasti D, jak je znázorněno na obrázku 3 vlevo.

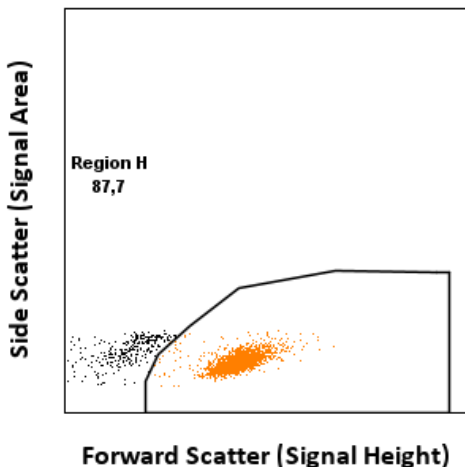
Zobrazte CD45+ lymfocyty (**Region C**) v grafu SSC-A vs. Forward Scatter Signal Height (FSC-H). Umístěte nové ohraničení vymezující CD45+ lymfocyty od menších událostí a zbytků (**Region G**), jak je znázorněno na obrázku 3 vpravo.

Obrázek 3 Obrázek vlevo vizualizuje odstranění nespecifických obarvených buněk, tj. trombocytů nebo agregátů. Oblast F byla použita k vymezení specificky obarvených buněk, které jsou CD45^{dim}SSC^{low} CD34+. Snímek vpravo vizualizuje ohraničení CD45+ lymfocytů (Region G) z oblasti C.



Zkopírujte ohraničení **regionu G** vymezující lymfocyty z **obr. 3** (pravý obrázek) a vložte ho do bodového grafu SSC-A vs. FSC-H obsahujícího události z **regionu F** a vytvořte **region H**, abyste odlišili shluk kmenových buněk CD34+ od menších událostí a zbytků. Buňky z regionu F (obrázek 3) nalezené uvnitř ohraničení **Region H** představují skutečné CD34+ kmenové buňky.

Obrázek 4 Obrázek představuje výběr pravých CD34+ kmenových buněk (Region H).



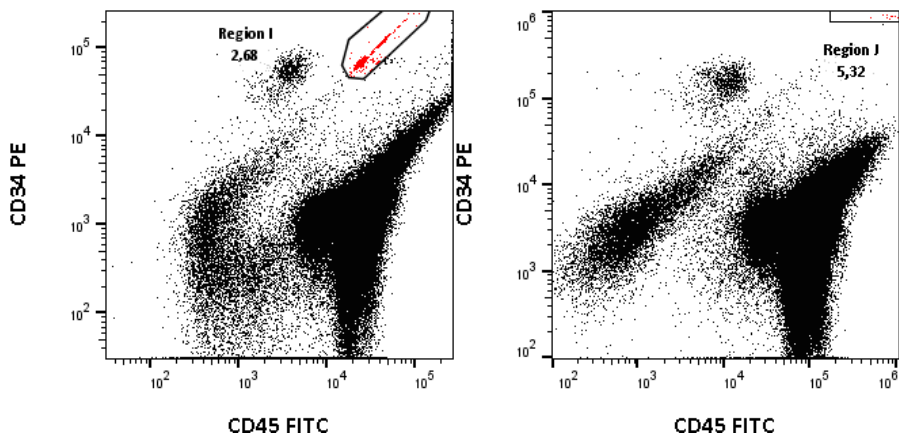
Pouze pro Single Platform metodu:

Pro zajištění správného umístění ohraničení pro fluorescenční kuličky (Region E), mělo by být provedeno kontrolní ohraničení (Region I, J, K), které je uvedené na obrázku 5 a 6.

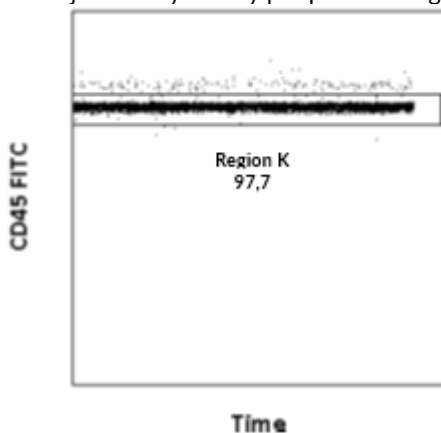
Zobrazte **všechny události** v CD34 PE vs. CD45 FITC a umístěte oblasti kolem fluorescenčního standardu počtu mikročástic vymezující mikročástice z BD TruCount™ (**Region I**) nebo mikročástice z Beckman Coulter Flow-Count™ (**Region J**).

POZNÁMKA: Velikost počítacích kuliček a fluorescenční vlastnosti se mohou u různých výrobců lišit.

Obrázek 5 Obrázek vlevo představuje velikost a fluorescenční vlastnosti kuliček BD TruCount™ Tube (Region I). Obrázek vpravo představuje velikost a fluorescenční vlastnosti kuliček BC Flow-Count™ Fluorospheres (Region J).



Obrázek 6 Snímek vizualizuje všechny kuličky pro počítání singletů v čase (Region K).



POZNÁMKA: Jakákoli nehomogenita v oblasti K (narušení akvizice, pokles fluorescence) by měla být přezkoumána. Nehomogenní akvizice událostí nebo akvizice, která není kolmá na osu CD45 FITC, naznačuje problémy s fluidikou průtokového cytometru.

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:

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

<i>CD34⁺ abs</i>	absolutní počet živých CD34 ⁺ kmenových buněk v 1 µl krevního vzorku
<i>WBC abs</i>	absolutní počet živých leukocytů v 1 µl krevního vzorku
<i>% CD34⁺</i>	procentuální zastoupení živých CD34 ⁺ kmenových buněk ze všech živých leukocytů
<i>Region B</i>	počet událostí v Regionu B (leukocyty)
<i>Region H</i>	počet událostí v regionu pro pravé CD34 ⁺ kmenové buňky
<i>Region E</i>	počet událostí v Regionu E (mikropartikule)
<i>P</i>	počet mikropartikulí v jednom testu (počet mikropartikulí v testové zkumavce) udávaný výrobcem
<i>V</i>	objem krevního vzorku – 100 µl
<i>ŘF</i>	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:

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

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 pravé CD34⁺ kmenové buňky

ŘF ředící faktor (ředění krevního vzorku před zpracováním). ŘF = 2 znamená, že 1 díl krevního vzorku (100 µl) byl naředěn 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 (HLDA III ⁽¹⁹⁾).

Monoklonální protilátka 4H11[APG] rozpoznává epitop třídy III lidského CD34 antigenu (mukosialin). Specifická protilátky byla potvrzena workshopem HLDA (HLDA VI ⁽²⁰⁾).

Přesnost

Přesnost metody byla stanovena porovnáním prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s dobře dokumentovanou interní dvouplatformní metodou akreditované klinické laboratoře (koktejl jednobarevných konjugovaných protilátek od různých výrobců v kombinaci s lyzačním roztokem na bázi chloridu amonného) paralelním barvením 75 vzorků krve nebo tkání analyzovaných průtokovým cytometrem BD FACSCanto™ II nebo Beckman Coulter Navios (tabulka 4, 5, 6). Parametry lineární regresní analýzy jsou uvedeny v tabulkách 4 - 6.

Tabulka 4 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky v periferní krvi (porovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s interní metodou akreditované klinické laboratoře) analyzované průtokovým cytometrem BD FACSCanto™ II nebo Beckman Coulter Navios.

Srovnání ED7080 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 5 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky v produktech leukaferézy (porovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s interní metodou akreditované klinické laboratoře) analyzované průtokovým cytometrem BD FACSCanto™ II nebo Beckman Coulter Navios.

Srovnání ED7080 s akreditovanou metodou						
Leukaferézní 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 6 Lineární regresní analýza pro CD34+ kmenové buňky v kostní dřeni (porovnání prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s interní metodou akreditované klinické laboratoře) analyzované průtokovým cytometrem BD FACSCanto™ II nebo Beckman Coulter Navios.

Srovnání ED7080 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 krevního derivátu „Buffy Coat“ zdravého dárce krve, který byl během 1 dne naředěn 11 po sobě jdoucími (sériovými; 2násobnými) ředěními CD34+ buňkami (KG-1) měřeným během 1 dne 1 operátorem na cytometru BD FACSCanto™ II. Pro vyhodnocení očekávaných a naměřených hodnot v každém bodě ředění byla použita lineární regresní funkce. Rozsah linearity je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7 Linearita prostředku analyzovaná pomocí BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
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™. Variační koeficienty (CV) jsou uvedeny v tabulkách níže (Tabulka 8 a 9).

Tabulka 8 Opakovatelnost prostředku analyzovaná pomocí BD FACSLyric™

BD FACSLyric™					
Cílová populace	Jednotky	n	Vyhodnocený rozsah hodnot	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0035	7,2
	buněk/μl	10	8-20	1.0	7,2

Tabulka 9 Opakovatelnost prostředku analyzovaná pomocí Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™					
Cílová populace	Jednotky	n	Vyhodnocený rozsah hodnot	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0047	9,4
	buněk/μl	10	7-20	1,2	9,4

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 10 a 11).

Tabulka 10 Reprodukovatelnost prostředku analyzovaná pomocí BD FACSLyric™

Reprodukovatelnost – BD FACSLyric™						
Typ vzorku	Očekávaný rozsah (%)	Očekávaná průměrná hodnota (%)	Naměřená průměrná hodnota (%)	SD	CV (%)	Naměřený rozsah hodnot
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 – 1,95	1,65	1,67	0.06	3,6	1,46-1,70

Tabulka 11 Reprodukovatelnost prostředku analyzovaná pomocí Sysmex XF-1600™

Reprodukovatelnost – Sysmex XF-1600™						
Typ vzorku	Očekávaný rozsah (%)	Očekávaná průměrná hodnota (%)	Naměřená průměrná hodnota (%)	SD	CV (%)	Naměřený rozsah hodnot
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 – 1,95	1,65	1,54	0,04	2,8	1,48-1,62

POZNÁMKA: Pro analýzu průtokovou cytometrií byly použity následující průtokové cytometry a verze softwaru:

BD FACSCanto™ II	BD FACSDiva Software – verze 8.0.2
BD FACSLytic™	BD FACSSuit Software – verze 1.5
Sysmex XF-1600™	IPU Software – verze 0(0.09-00)
Navios Ex	Navios Ex Software v2.0

Pro absolutní počty buněk byl použit dvouplatformový hematologický analyzátor s následujícími specifikacemi:

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

Pro vyhodnocení naměřených dat byla použita následující analytická platforma: FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - verze 10.9.0

12. Vlastnosti klinické funkce

Klinické údaje byly shromážděny na klinickém pracovišti. Klinická výkonnost prostředku ED7080 byla stanovena porovnáním prostředku CD34 QuantiFlowEx Kit s interní metodou akreditované klinické laboratoře. Testováno bylo 75 vzorků, včetně periferní krve, produktů leukaferézy a vzorků kostní dřeně. Rozdíl mezi metodami byl menší než 10 % u 67 ze 75 stanovení, což znamená, že výsledky získané oběma metodami byly do značné míry stejné. Relativní rozdíly mezi metodami se pohybovaly od -13 % do +11 %. Tyto údaje byly dále porovnány pomocí lineární regresní analýzy a Bland-Altmanova hodnocení shody mezi metodami (relativní rozdíl v počtech), které ukázalo velmi dobrou shodu mezi metodami. Průměrná hodnota relativních rozdílů v počtu mezi oběma metodami je 1 % a standardní chyba 6 %.

Pokyny pro stanovení CD34+ HSC doporučují porovnávat výsledky s maximálním přijatelným relativním rozdílem mezi duplikáty do 10 % ⁽²¹⁾. Podle těchto doporučení poskytují tyto metody údaje, na které lze pohlížet jako na vzájemně rovnocenné.

13. Očekávané hodnoty

Prostředek je určen k detekci a počítání celkového počtu životaschopných krvetvorných buněk a samo o sobě nestanoví žádnou diagnózu, u které by bylo možné stanovit normální rozmezí hodnot.

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

14. Omezení

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

Vzorek s velmi vysokým počtem WBC by měl být před barvením zředěn v PBS, aby byl počet leukocytů nižší než 20×10^3 buněk/ μl ⁽²²⁾.

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) Tate J, et al. Interferences in immunoassay. Clin Biochem Rev. 2004 May; 25(2):105-20.
- 3) Selby C. Interference in immunoassay. Ann Clin Biochem. 1999 Nov;36(6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603.
- 4) Frengen J, et al. Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays. Clinical Chemistry. 1994 March;40(3):420-425, doi: 10.1093/clinchem/40.3.420.
- 5) Htun NM, 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. doi: 10.1038/s41467-017-00138-x.
- 6) Lecoer H, et al. 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. 1996;198(1):87-99. doi: 10.1016/0022-1759(96)00148-2.
- 7) XUE Y, et al. 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. doi: 10.3969/j.issn.1673-8640.2022.12.013.

- 8) Higgins J, et al. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07.
- 9) Lam WK, et al. 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.
- 10) de Jonge G, et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396.
- 11) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56.
- 12) Achour L, et al. CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009;113(9): 1938–1947. doi: 10.1182/blood-2008-02-141275.
- 13) Van Caeneghem Y, et al. 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.* 2017;6:3, doi: 10.1080/2162402X.2017.1283460.
- 14) Stronkhorst A, et al. CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology,* 1992;27(194):61-65, doi: 10.3109/00365529209096029.
- 15) Zinzani, PL, et al. 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.* 2022;148:177–190. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>.
- 16) Whiteman KR, et al. 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.
- 17) Bartels EM, et al. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis.* 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071.
- 18) van Ierssel SH, et al. Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE.* 2012;7(2):e31496. doi: 10.1371/journal.pone.0031496.

- 19) McMichael AJ, et al. eds. Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- 20) Kishimoto T, et al. eds. Leucocyte Typing VI. New York: Garland Publishing, Inc., 1997.
- 21) 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.
- 22) Keeney M, et al. "Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering." Cytometry vol. 34,2 (1998): 61-70. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19980415)34:2<61::AID-CYTO1>3.0.CO;2-F.

16. Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti

Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti bude k dispozici v databázi Eudamed na adrese <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Do té doby je souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti k dispozici na vyžádání.

17. Použití ochranných známek třetích stran

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, Trucount™, FlowJo™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson a Company, Sysmex XF-1600™ je registrovaná ochranná známka firmy Sysmex Corporation, CD-Chex CD34® je registrovaná ochranná známka firmy Streck, Navios™, Flow-Count™ Fluorospheres je registrovaná ochranná známka firmy Beckman Coulter.

18. Historie revizí

Verze 5, ED7080_IFU_v5

Nové uspořádání IFU podle požadavků IVDR (EU) 2017/746. Přidání identifikačního čísla označeného subjektu. Přidána nová kapitola číslo 16. Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti. Úprava textu strategie gatingu, byla doplněna doporučením pro Single-platform gating. Objasnění pojmu faktor ředění. Změny v kapitolách 11., 12., 14. a 15. (doplnění analytických a klinických údajů).

19. 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

20. Zplnomocněný zástupce

N/A

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