

# exbio

## KOMBITEST B/NK Cell 4-color 50 testes | Cat. N.º ED7735



### Instruções de Utilização (PT)

Versão: ED7735\_IFU\_v2\_PT

Data de emissão: 03-12-2024

#### Símbolos utilizados na etiquetagem do dispositivo

	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Limites de temperatura
	Marca CE de conformidade Número de identificação do órgão notificado		Manter afastado da luz solar
	Fabricante		Marca UKCA
	Identificador Único de Dispositivo		
	Consultar instruções de utilização		
	Contém o suficiente para <n> testes		
	Número de catálogo		
	Código de lote		
	Data de validade		

## 1. Finalidade prevista

O KOMBITEST B/NK Cell 4-color destina-se à deteção e contagem de populações e subconjuntos de linfócitos no sangue total humano por citometria de fluxo.

### O que é detetado e/ou medido

O dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color deteta e mede as percentagens relativas e as contagens absolutas de células T (CD3+), células B (CD3-CD19+) e células NK (CD3-CD16+56+).

### Função do dispositivo

O dispositivo foi concebido para a avaliação imunológica de pacientes normais e pode ajudar no diagnóstico de pacientes com, ou suspeitos de terem, imunodeficiência.

### Contexto do estado fisiológico ou patológico

As frequências das populações de linfócitos medidas pelo dispositivo podem ser afetadas por várias condições patológicas e são úteis na avaliação de:

- Células T CD3+ em infeções virais e imunodeficiências hereditárias <sup>(1, 7)</sup>
- Células B CD3-/CD19+ em doenças autoimunes <sup>(2)</sup>
- Células NK CD3-/CD16+56+ em imunidade inata e defeito imunológico <sup>(4, 5)</sup>

### Tipo de ensaio

Não automatizado

Quantitativo

### Tipo de espécime requerido

Amostra de sangue total periférico humano anticoagulado

### População de teste

Não se destina a uma população específica.

## 2. Utilizador pretendido

O dispositivo destina-se apenas a uso profissional em laboratório. Não para testes próximos dos pacientes ou autoteste.

### Requisitos de qualificação

O utilizador previsto deve possuir conhecimentos especializados de ponta em análise de citometria de fluxo de células humanas, técnicas laboratoriais padrão, incluindo técnicas de pipetagem, manipulação segura e adequada de espécimes derivados do corpo humano.

O utilizador previsto deve cumprir a norma EN ISO 15189 ou outras disposições nacionais, quando aplicável.

### 3. Princípio de análise

O princípio da análise baseia-se na deteção da ligação de um anticorpo monoclonal a uma molécula específica (antigénio) expressa por determinados glóbulos humanos. Os anticorpos monoclonais utilizados na análise são marcados com diferentes fluorocromos que são excitados por um feixe de laser de um citómetro de fluxo durante a aquisição de uma amostra de sangue corada com anticorpos. A fluorescência subsequente (emissão de luz) de cada fluorocromo presente num glóbulo adquirido é recolhida e analisada pelo instrumento. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à densidade de expressão do antigénio numa célula tornando possível separar diferentes subconjuntos de células.

### 4. Reagente(s) fornecido(s)

#### Conteúdos

O dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color é suficiente para 50 análises e é fornecido com o seguinte reagente:

1 ampola (1 ml) que contém uma combinação pré-misturada de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos CD3 FITC / CD16 PE + CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC, diluída para concentrações ótimas numa solução salina estabilizadora tamponada com fosfato (PBS) com azida de sódio 15 mM e 0.2% de albumina sérica bovina (BSA).

#### Composição

**Tabela 1** Descrição dos componentes ativos

Antigénio	Fluorocromo	Clone	Isótipo	Concentração (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. Materiais necessários, mas não incluídos

Tubos de ensaio de fundo redondo de 12 x 75 mm

Solução de lisagem de eritrócitos (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., Cat. N.º ED7066 ou CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, Cat. N.º BD303500)

Água desionizada (Reagent-grade)

Células de controlo do processo (Streck CD-Chex Plus®, Cat. N.º 213323 ou controlo equivalente de células lisáveis)

## 6. Equipamento necessário

Pipeta automática com pontas descartáveis (20 - 100 µl) para pipetagem de espécimes e reagentes

Dispensador de líquidos ou pipeta com pontas descartáveis (0,5 – 2 ml) para dispensar a solução de lisagem de eritrócitos

Misturador Vortex

Analizador hematológico (para contagens absolutas de células) capaz de efetuar contagens de glóbulos brancos (leucócitos) e de linfócitos por µl de amostra

Citómetro de fluxo com duas fontes de excitação a laser (488 nm e ~635 nm), detetores para espalhadores, filtros óticos e detetores de emissões apropriados para recolher sinais dos fluorocromos indicados na Tabela 2.

**Tabela 2** Característica espectral do fluorocromo utilizado no dispositivo

Fluorocromo	Excitação [nm]	Emissões [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP	488	677
APC	630 – 640	660

**AVISO:** O dispositivo foi testado em citómetros de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), DxFLEX (Beckman Coulter) e Sysmex XF-1600™ (Sysmex Corporation).

## 7. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2-8 °C.

Evitar a exposição prolongada à luz.

Não congelar.

Ver Secção 10 Procedimento (Preparação de Reagentes) para informações sobre a estabilidade de In-Use e o prazo de validade após a primeira abertura, juntamente com as condições de armazenamento e estabilidade das soluções de trabalho (quando aplicável).

## 8. Avisos, precauções e limitações de utilização

### Classificação de Perigos GHS

Consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS) disponível na página do produto em [www.exbio.cz](http://www.exbio.cz) para obter informações completas sobre os riscos colocados pelas substâncias e misturas químicas contidas no Produto e como devem ser manuseadas e eliminadas.

## Perigo biológico

Amostras biológicas humanas e amostras de sangue e quaisquer materiais que entrem em contacto com elas são sempre considerados como materiais infecciosos.

Utilizar equipamento de proteção pessoal e de segurança para evitar o contacto com a pele, olhos e membranas mucosas.

Seguir todas as leis, regulamentos e procedimentos aplicáveis para o manuseamento e eliminação de materiais infecciosos.

## Evidência de deterioração

O aspeto normal do reagente fornecido é um líquido límpido. Não utilizar o reagente se observar qualquer alteração na aparência, por exemplo, turbidez ou sinais de precipitação.

## Limitação de utilização

Não utilizar após a data de validade indicada nos rótulos dos produtos.

## 9. Espécime

Utilizar sangue periférico venoso recolhido em recipiente de amostra classificado como dispositivo médico, com a presença de EDTA anticoagulante.

**AVISO:** Determinar a contagem absoluta de leucócitos e linfócitos na amostra de sangue recolhida utilizando um analisador hematológico. O dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color, por si só, não fornece a contagem absoluta de células.

As amostras de sangue com uma contagem de leucócitos superior a  $40 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$  devem ser diluídas em PBS antes do processamento da amostra.

Processar a amostra de sangue o mais tardar 24 horas após a colheita.

Conservar o espécime à temperatura do laboratório (20 - 25°C). Não refrigerar a amostra.

## Interferência Endógena

Com base na investigação da literatura científica, as fontes de interferência endógenas são identificadas na Tabela 3.

**Tabela 3** Interferência Endógena do dispositivo

Interferência Endógena	Impacto	Referência
Albumina	A albumina pode interferir em concentrações elevadas devido à sua capacidade de se ligar e de libertar grandes quantidades de ligandos.	8, 9, 10
Bilirrubina (itérica)	A bilirrubina pode aumentar a fluorescência de fundo das células devido à sua elevada	11, 12, 13

(não conjugado)	auto-fluorescência.	
Resíduos celulares (após lise)	Os detritos celulares podem provocar contagens incorretas de células e esgotar o anticorpo no dispositivo.	14, 15
Eritrócitos	Uma lise insuficiente e a presença de glóbulos vermelhos na amostra podem afetar a contagem de células.	16
Hemoglobina	As amostras hemolisadas podem produzir resultados pouco fiáveis.	17
Anticorpos humanos anti-murinos	Pode afetar a funcionalidade do dispositivo (capacidade de se ligar a antígenos de superfície celular)	18, 19, 20, 21, 22, 23
Imunoglobulinas	Não pode ser lavado no método de plataforma única e pode afetar a contagem de subconjuntos de linfócitos.	24
Fatores reumatóides	A presença de RF interfere com os MIA (imunoenaios multiplex).	25
Triglicéridos	Níveis elevados de lípidos em circulação podem afetar a análise por citometria de fluxo de determinadas populações de células sanguíneas.	26

### **Interferência Exógena**

As amostras com mais de 24 horas podem produzir resultados erróneos.

As amostras refrigeradas podem produzir resultados incorretos.

Uma preparação desadequada da solução de lise de eritrócitos (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., Cat. N.º ED7066 ou CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, Cat. N.º BD303500) pode produzir resultados erróneos. Seguir as instruções do fabricante para a utilização da solução de lise de eritrócitos.

## **10. Procedimento**

### **Preparação do(s) reagente(s) fornecido(s)**

Não é necessária qualquer preparação de reagentes.

Levar o reagente à temperatura ambiente antes da sua utilização. Manter o recipiente primário do dispositivo seco.

Utilizar o reagente diretamente a partir do recipiente de origem primário. O tempo de utilização do reagente (exposição à luz e a temperaturas elevadas) não deve exceder 4 horas por dia.

Após a primeira abertura, o reagente mantém as suas características de desempenho até à data de validade se for armazenado nas condições indicadas no respetivo recipiente de origem primário.

**CUIDADO:** Não diluir o reagente.

## **Preparação de materiais necessários, mas não incluídos**

Diluir a solução concentrada de lisagem de eritrócitos com água deionizada de acordo com as instruções do fabricante. A solução diluída de lisagem de eritrócitos (1X) é estável durante 1 mês quando armazenada num dispensador de líquidos ou num recipiente fechado à temperatura ambiente.

## **Controlo da qualidade**

Utilizar células de controlo Streck CD-Chex Plus® ou equivalentes como controlo processual positivo para garantir que o dispositivo funciona como pretendido. As células Streck CD-Chex Plus® fornecem valores estabelecidos para as contagens percentuais positivas e absolutas de células T, células B, granulócitos, monócitos e células NK, incluindo dois níveis clinicamente relevantes de células CD4+.

Corar as células de controlo utilizando o reagente KOMBITEST B/NK Cell 4-color de acordo com o processamento da amostra especificado nas Instruções de utilização. Verificar se os resultados obtidos (% de células positivas) estão dentro do intervalo esperado para o lote de células de controlo utilizado.

## **Coloração de amostras**

1. Para cada amostra, etiquetar um tubo de ensaio de fundo redondo de 12 × 75 mm com a identificação apropriada da amostra.
2. Pipetar 20 µl de reagente KOMBITEST B/NK Cell 4-color para o fundo do tubo de ensaio de 12 x 75 mm.
3. Pipetar 50 µl de amostra de sangue bem misturada para o fundo do tubo de ensaio.

**CUIDADO:** Evitar a pipetagem de sangue na lateral do tubo de ensaio. Se o esfregaço ou gota de sangue permanecer na lateral do tubo, pode não ser manchado com o reagente ou os eritrócitos podem não ser lisados e o resultado da análise pode não ser válido.

4. Vortexar e incubar o tubo de ensaio durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
5. Adicionar 500 µl de solução diluída de lisagem (1X) ao tubo de ensaio.
6. Vortexar e incubar o tubo de ensaio durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.

Adquirir a amostra corada imediatamente no citómetro de fluxo. Se a amostra corada não for adquirida imediatamente, armazenar a 2 – 8 °C no escuro e analisar no prazo de 24 horas.

**CUIDADO:** Vortexar a amostra corada imediatamente antes da aquisição no citómetro de fluxo para evitar agregados.

## **Análise de citometria de fluxo**

O medidor de caudal selecionado para utilização com o dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color deve ser calibrado numa base de rotina utilizando micro esferas fluorescentes para assegurar uma sensibilidade estável dos detetores de acordo com as instruções do fabricante do medidor de caudal.

Se não for mantido corretamente, o ocitómetro defluxopode produzir resultados falsos.

Consultar as especificações do fabricante para os lasers e detetores fluorescentes de acordo com as características de excitação e emissão dos fluorocromos na Secção 6 Equipamento necessário.

Definir as tensões nos detetores de fluorescência de interesse antes da análise de amostras coradas. A tensão num detetor de PMT deve ser definida suficientemente alta, para que o mínimo de eventos com manchas negativas interfira com o 0º canal no eixo de fluorescência. Além disso, a tensão do detetor de PMT não deve exceder os valores em que os eventos positivos são pressionados para o eixo direito.

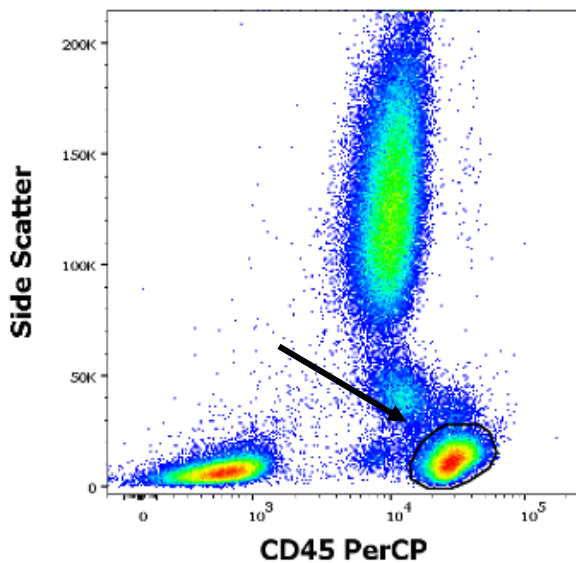
Compensar os sinais de fluorescência entre detetores antes ou depois da aquisição de dados. Os dados podem ser mal interpretados se os sinais de fluorescência forem compensados incorretamente ou se as delimitações estiverem posicionadas de forma imprecisa.

Para a análise de dados medidos, é possível utilizar software de citómetro desenvolvido pelo fabricante, ou software dedicado à análise de dados de citometria offline (por exemplo FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

## Análise dos dados da amostra corada do KOMBITEST B/NK Cell 4-color

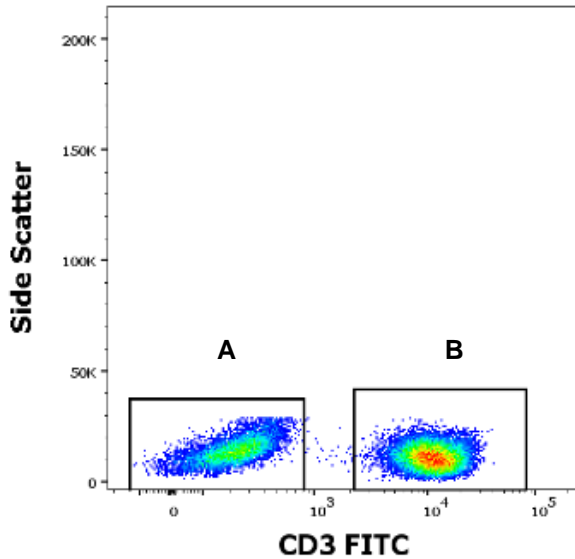
Visualizar os dados compensados num diagrama de dispersão lateral (SSC) versus o CD45 PerCP. Delimitar a população de linfócitos CD45+ como mostra a Figura 1.

**Figura 1** Delineação da população de linfócitos CD45+ (dados obtidos no BD FACSCanto™ II)



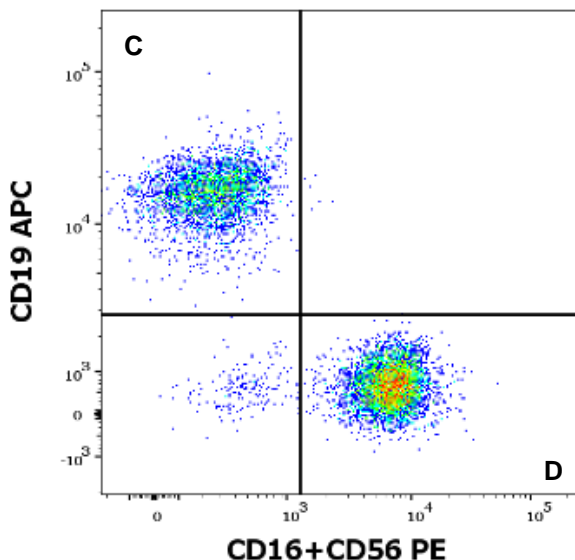
Representar os linfócitos CD45+ delimitados num diagrama de dispersão lateral (SSC) versus o CD3 FITC como mostra a Figura 2. Separar os linfócitos CD3+ e CD3- utilizando as delimitações apropriadas. Calcular a percentagem de células T (CD3+; região B na Figura 2) de todos os linfócitos.

**Figura 2** Separação dos linfócitos CD3+ e CD3- (dados obtidos no BD FACSCanto™ II)



Representar os linfócitos CD3- delimitados (região A na Figura 2) como CD19 APC versus CD16+CD56 PE como mostra a Figura 3. Definir as delimitações apropriadas e calcular a percentagem de células B (CD16-CD56-CD19+; região C na Figura 3) e de células assassinas naturais (NK) (CD16+CD56+CD19-; região D na Figura 3) de todos os linfócitos.

**Figura 3** Linfócitos CD3- num diagrama de pontos CD19 APC versus CD16+CD56 PE (dados obtidos no BD FACSCanto™ II)



### Cálculo e interpretação de resultados analíticos

Para obter contagens absolutas, utilizar a contagem absoluta de linfócitos determinada por um analisador hematológico. Consultar as instruções do fabricante do analisador hematológico. Utilizar as equações seguintes para a contagem absoluta do subconjunto de linfócitos necessário.

$$A \times \frac{B (\%)}{100 (\%)} = \text{Contagem absoluta do subconjunto necessário de linfócitos}$$

A = contagem absoluta de linfócitos (dados do analisador hematológico; células/ $\mu$ l)

B = percentagens relativas do subconjunto de linfócitos necessárias de todos os linfócitos (dados do citómetro de fluxo; %)

## 11. Desempenho analítico

### Especificações

O anticorpo TB3 reconhece o antígeno humano CD3 do complexo TCR/CD3. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (seminário HLDA XI).

O anticorpo 3G8 reconhece o antígeno humano CD16 (receptor Fc-gama de imunoglobulina de baixa afinidade do tipo III). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo seminário HLDA (seminário HLDA V <sup>(6)</sup>).

O anticorpo LT56 reconhece a isoforma leucocitária do antígeno humano CD56 (molécula de adesão celular neural 1). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (seminário HLDA X).

O anticorpo LT19 reconhece o antígeno humano CD19 (glicoproteína transmembranar de células B CD19). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (seminário HLDA X).

O anticorpo MEM-28 reconhece todas as isoformas leucocitárias do antígeno humano CD45 (receptor da proteína tirosina fosfatase tipo C). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo seminário HLDA (seminário HLDA III <sup>(3)</sup>).

### Exatidão

A exatidão do método foi medida no citómetro de fluxo BD FACSCanto™ II e determinada como uma comparação do dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color com um produto semelhante disponível no mercado KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, Cat. N.º ED7733) através da coloração paralela de 60 doadores de sangue saudáveis.

A exatidão do método foi apoiada pela coloração paralela de 81 pacientes (ver Quadro 5) suspeitos de terem uma condição patológica do sistema imunitário. Os parâmetros da análise de regressão linear são apresentados nos quadros 4 e 5.

**Tabela 3** Análise de regressão linear para subconjuntos de linfócitos em doadores saudáveis (comparação do dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color com o reagente KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, Cat. No. ED7733))

Subconjunto de Linfócitos	Unidade	n	Evolução	Interceção	R <sup>2</sup>
CD3+	%	60	0.994	0.003	1.00
	células/μl	60	0.992	9.958	1.00
CD3-CD16+CD56+	%	60	0.995	0.001	1.00
	células/μl	60	1.010	-2.796	1.00
CD3-CD19+	%	60	1.003	0.002	1.00
	células/μl	60	1.003	3.669	0.99

n = número de amostras de sangue

**Tabela 4** Análise de regressão linear para subconjuntos de linfócitos em pacientes com suspeita de patologias do sistema imunitário (comparação do dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color com o sistema AQUIOS CL Flow Cytometry System - Beckman Coulter, Inc.)

Subconjunto de Linfócitos	Unidade	n	Evolução	Interceção	R <sup>2</sup>
CD3+	%	81	1.042	-2.976	0.97
	células/μl	81	1.005	-0.010	1.00
CD3-CD16+CD56+	%	81	1.061	-0.626	0.98
	células/μl	81	1.078	-0.017	0.99
CD3-CD19+	%	81	1.023	-0.163	0.99
	células/μl	81	1.032	-0.006	1.00

n = número de amostras de sangue

### Linearidade

A linearidade do método foi verificada em 10 diluições em série de uma amostra de sangue enriquecida com leucócitos (buffy coat). As amostras de células foram coradas com KOMBITEST B/NK Cell 4-color em hexaplicados. As amostras foram analisadas utilizando os citómetros de fluxo BD FACSCanto™ II e Beckman Coulter DxFLEX. Observou-se que os dados medidos para os subconjuntos de linfócitos indicados eram lineares no intervalo de 368 - 10634 células/μl utilizando o BD FACSCanto™ II e 328 - 9061 células/μl utilizando o Beckman Coulter DxFLEX. Os subconjuntos de células estavam nos intervalos indicados nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6** Intervalos lineares dos subconjuntos de linfócitos analisados pelo BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	
Subconjunto de Linfócitos	Intervalo (células/ $\mu$ l)
CD3+	227 - 6163
CD3-CD16+CD56+	59 - 1609
CD3-CD19+	34 - 912

**Tabela 7** Intervalos lineares dos subconjuntos de linfócitos analisados pelo Beckman Coulter DxFLEx

Beckman Coulter DxFLEx	
Subconjunto de Linfócitos	Intervalo (células/ $\mu$ l)
CD3+	217 - 6051
CD3-CD16+CD56+	69 - 1669
CD3-CD19+	33 - 889

### Limite de deteção / Limite de quantificação / Corte do ensaio

Os dados de linearidade foram utilizados para determinar o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ).

O limite de deteção foi definido como o valor mais baixo de contagem absoluta de células não nulas mais  $3 \times SD$  (desvio padrão) para cada subconjunto de linfócitos (ver Tabelas 8 – 9).

O limite de quantificação foi definido como o valor mais baixo na gama de linearidade das concentrações de analito apresentadas como contagem absoluta do subconjunto de linfócitos em que o CV das hexaplicatas não excedeu 10% e a recuperação se situou entre 90% e 110% (ver Tabelas 8 – 9).

Os resultados do ensaio não são exclusivamente diagnósticos para uma única entidade clínica, pelo que não é possível estimar o ponto de corte do ensaio.

**Tabela 8** Limites de deteção e quantificação no BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II				
Subconjunto de Linfócitos	Contagem mais baixa de células diferentes de zero (células/ $\mu$ l)	$3 \times SD$ (SD)	LOD (células/ $\mu$ l)	LOQ (células/ $\mu$ 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** Limites de detecção e quantificação no Beckman Coulter DxFLEX

<b>Beckman Coulter DxFLEX</b>				
<b>Subconjunto de Linfócitos</b>	<b>Contagem mais baixa de células diferentes de zero (células/<math>\mu</math>l)</b>	<b>3<math>\times</math>SD (SD)</b>	<b>LOD (células/<math>\mu</math>l)</b>	<b>LOQ (células/<math>\mu</math>l)</b>
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

**Repetibilidade**

A repetibilidade do ensaio foi medida em dez amostras de sangue em hexaplicado. As amostras foram analisadas utilizando os citômetros de fluxo BD FACSCanto™ II e Beckman Coulter DxFLEX. Os coeficientes de variação (CV) são apresentados nas tabelas seguintes (Tabela 10 e 11).

**Tabela 10** Repetibilidade do dispositivo no BD FACSCanto™ II

<b>BD FACSCanto™ II</b>					
Subconjunto de Linfócitos	Unidade	n	Média	SD	%CV
CD3+	%	10	66.47	0.29	0.44
	células/ $\mu$ l	10	1362	6.19	
CD3-CD16+CD56+	%	10	18.66	0.21	1.26
	células/ $\mu$ l	10	374	4.36	
CD3-CD19+	%	10	13.69	0.20	1.57
	células/ $\mu$ l	10	284	4.35	

**Tabela 11** Repetibilidade do dispositivo no Beckman Coulter DxFLEX

<b>Beckman Coulter DxFLEX</b>					
Subconjunto de Linfócitos	Unidade	n	Média	SD	%CV
CD3+	%	10	65.99	0.59	0.92
	células/ $\mu$ l	10	1352	11.67	
CD3-CD16+CD56+	%	10	19.08	0.44	2.44
	células/ $\mu$ l	10	382	8.62	
CD3-CD19+	%	10	13.55	0.34	2.59
	células/ $\mu$ l	10	281	6.73	

## Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi medida em 2 amostras de sangue estabilizadas (CD-Chex Plus® e CD-Chex Plus® CD4 Low) nas mesmas condições durante 15 dias utilizando 3 lotes do dispositivo (5 dias cada). As amostras foram analisadas utilizando os citômetros de fluxo BD FACSCanto™ II e Beckman Coulter DxFLEX. Os coeficientes de variação (CV) são apresentados nas tabelas seguintes (Tabela 12 e 13).

**Tabela 12** Reprodutibilidade do dispositivo no BD FACSCanto™ II

Subconjunto de Linfócitos	Material	Unidade	Média	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	77.39	0.24	0.31
		células/µl	1909	5.97	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	61.38	0.55	0.90
		células/µl	891	8.04	
CD3-CD16+CD56+	CD-Chex Plus®	%	10.57	0.19	1.84
		células/µl	261	4.81	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.28	0.46	2.37
		células/µl	280	6.64	
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11.20	0.13	1.13
		células/µl	276	3.12	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	17.95	0.38	2.13
		células/µl	261	5.55	

**Tabela 13** Reprodutibilidade do dispositivo no Beckman Coulter DxFLEX

Subconjunto de Linfócitos	Material	Unidade	Média	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76.77	0.27	0.36
		células/µl	1894	6.77	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60.53	0.38	0.62
		células/µl	878	5.45	
CD3-CD16+ CD56+	CD-Chex Plus®	%	10.83	0.21	1.96
		células/µl	267	5.23	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.54	0.31	1.61
		células/µl	284	4.55	
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11.36	0.23	2.03
		células/µl	280	5.68	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	18.23	0.43	2.38
		células/µl	265	6.31	

**AVISO:** Todos os desempenhos analíticos foram medidos utilizando a solução de lisagem de eritrócitos EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Cat. N.º ED7066).

Para análise de citometria de fluxo foram utilizados os seguintes citômetros de fluxo, incluindo a versão do software:

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

Para contagens absolutas de células foi utilizado o analisador hematológico de método de plataforma dupla com as seguintes especificações:

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

Para avaliação dos dados medidos foi utilizada a seguinte plataforma de análise:

FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - versão 10.9.0

## 12. Desempenho clínico

### Pacientes com imunodeficiência primária

Os dados clínicos foram recolhidos num centro clínico em 30 pacientes com suspeita de Imunodeficiência Comum Variável (CVID). O desempenho clínico do dispositivo ED7735 foi determinado através da comparação do dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color utilizando a solução de lisagem de eritrócitos

EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Cat. N.º ED7066) com método de laboratório clínico acreditado (AQUIOS CL Flow Cytometry System - Beckman Coulter, Inc.).

Os resultados da avaliação do estado imunitário dos pacientes foram avaliados de acordo com a sua imunodeficiência (Tabela 14).

**Tabela 14** Desempenho clínico do dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color – pacientes com COVID

		Estado imunitário avaliado através de método de laboratório clínico acreditado	
		Imunodeficiência	Estado normal
Estado imunitário avaliado através do dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color	Imunodeficiência	23 pacientes	0 pacientes
	Estado normal	0 pacientes	7 pacientes

### 13. Valores esperados

#### Intervalo de Referência

**Tabela 15** Intervalos de referência de doadores de sangue saudáveis medidos no BD FACSCanto™ II

Subconjunto de Linfócitos	n	Unidade	Faixa		Mediana
			Mínimo	Máximo	
CD3+	60	%	57.8	87.2	73.0
	60	células/ $\mu$ l	766	2105	1405
CD3-CD16+ CD56+	60	%	4.3	31.4	14.7
	60	células/ $\mu$ l	82	595	281
CD3-CD19+	60	%	2.8	23.5	10.1
	60	células/ $\mu$ l	61	630	184

Os intervalos de referência na Tabela 15 foram estabelecidos em pacientes saudáveis que foram considerados doadores de sangue de acordo com a legislação da República Checa por atenderem a critérios rigorosos para um dador de um banco de sangue. Os dados foram medidos no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

Os intervalos de referência específicos podem variar dependendo da região e da população na qual os valores foram estabelecidos. Por este motivo, os laboratórios devem estabelecer os seus próprios intervalos de referência normais para os subconjuntos de linfócitos identificados com o KOMBITEST B/NK Cell 4-color a partir da população local de dadores normais devido a variações de valores relacionadas com a idade, o sexo, as características clínicas e a etnia.

## 14. Limites

O dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color não foi validado para utilização em amostras colhidas com anticoagulantes do tipo heparina ou citrato de dextrose ácida (ACD) para a determinação de contagens relativas e absolutas.

O dispositivo KOMBITEST B/NK Cell 4-color não se destina ao rastreio e/ou à fenotipagem de amostras de leucemia e linfoma.

As contagens absolutas não são comparáveis entre laboratórios que utilizam equipamento diferente de vários fabricantes.

## 15. Referências

- 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 Lecoeur, 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, *Oncolmunology*, 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. Resumo da segurança e do desempenho**

O resumo da segurança e do desempenho estará disponível na base de dados Eudamed em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Até lá, o resumo da segurança e do desempenho está disponível mediante pedido.

## **17. Utilização de Marcas Registradas de Terceiros**

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, BD Multitest™ e FlowJo™ são marcas registadas da Becton, Dickinson and Company. CD-Chex Plus® é uma marca registada da Streck. CyLyse™ FX, Sysmex XN-1000™ e Sysmex XF-1600™ são marcas registadas da Sysmex Corporation. VenturiOne® é uma marca registada da Applied Cytometry. Infinicyt™ é uma marca registada da Cytognos S.L..

## **18. Histórico de revisões**

Versão 2, ED7735\_IFU\_v2

- 1) Adição do número de identificação do organismo notificado.
- 2) Correção do texto na secção "Contexto de um estado fisiológico ou patológico".
- 3) Interferência endógena e exógena adicionada.
- 4) Adição do capítulo Precisão.
- 5) Introdução de uma nova secção: Limite de deteção / Limite de quantificação / Limite do ensaio
- 5) Secção 13. Valores esperados – pequenas correções de texto.
- 6) Referências atualizadas.
- 7) Adicionado o novo capítulo número 16. Resumo da segurança e do desempenho.

## **19. Fabricante**

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

**Informação de contacto**

info@exbio.cz

technical@exbio.cz

orders@exbio.cz

www.exbio.cz

**20. Representantes autorizados**

N/A

**AVISO:** Qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade local competente.