

exbio

KOMBITEST T Cell 4-color 50 testů | Kat. č. ED7734

IVD **CE**₂₂₆₅

Návod k použití (CS)

Verze: ED7734_IFU_v3_CS

Datum vydání: 17-04-2025

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 přes slunečním zářením
	Výrobce	UKCA	Označení shody UKCA
UDI	Jedinečná identifikace prostředku (UDI)		
	Čtěte návod k použití		
	Obsah postačuje pro <n> testů		
REF	Katalogové číslo		
LOT	Kód dávky		
	Použití do data		

1. Určený účel prostředku

KOMBITEST T Cell 4-color detekuje a počítá lymfocytární populace a subpopulace z plné lidské krve pomocí průtokové cytometrie.

Co se zjišťuje a/nebo měří

KOMBITEST T Cell 4-color detekuje a měří procenta a absolutní počty T buněk (CD3+), pomocných/induktorových (CD3+CD4+) a supresorových/cytotoxických (CD3+CD8+) subpopulací T buněk.

Funkce prostředku

Prostředek je určen k posouzení imunitního stavu normálních pacientů a může pomoci při diagnostice pacientů s imunodeficiem nebo podezřením na nějaký typ imunodeficitu.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Frekvence populací lymfocytů měřené pomocí prostředku mohou být ovlivněny různými patologickými stavy a vyhodnocení jejich relativního a absolutního počtu lze využít při posouzení:

- CD3+/CD4+ pomocných/indukujících T buněk při sledování HIV (1, 4, 5, 7)
- CD3+/CD8+ cytotoxických T buněk u virových infekcí a dědičných imunodeficiencí (2, 3, 4, 9, 10, 11, 13)

Typ testu

Není automatizovaný

Kvantitativní

Typ požadovaného vzorku

Vzorek lidské antikoagulované periferní plné krve.

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.

4. Poskytované materiály

Obsah

Prostředek KOMBITEST T Cell 4-color vystačí na provedení 50 testů a je dodáván ve formátu:

1 lahvička (1 ml) obsahující kombinaci fluorescenčně značených monoklonálních protilátek CD3 FITC / CD45 PerCP / CD4 APC / CD8 PE, naředěných na optimální koncentrace ve stabilizačním fosfátovém pufru (PBS) s obsahem 15mM azidu sodého a 0,2 % hovězího sérového albuminu (BSA).

Složení

Tabulka 1 Popis aktivních složek

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

5. Nutné, ale neposkytované materiály

Testovací zkumavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Lyzační roztok (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., Kat. č. ED7066 nebo CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, Kat. č. BD303500)

Deionizovaná voda

Kontrolní buňky (Streck CD-Chex Plus®, Kat. č. 213323 nebo ekvivalentní lyzovatelné buněčné kontroly)

6. Nutná zařízení

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

Dávkovač kapalin nebo pipeta s jednorázovými špičkami (0,5 – 2 ml) pro dávkování lyzačního roztoku

Vortex

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

Průtokový cytometr vybavený dvěma laserovými excitačními zdroji (488 nm a ~ 635 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
PerCP	488	677
APC	630 – 640	660

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

7. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

Nezamrazujte.

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

8. Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

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

Biologické riziko

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

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

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

Projevy znehodnocení prostředí

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 žilní periferní krev odebranou do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem EDTA.

POZNÁMKA: Stanovte absolutní počet bílých krvinek a počet lymfocytů v odebraném vzorku krve pomocí hematologického analyzátoru.

KOMBITEST T Cell 4-color neposkytuje absolutní počty buněk.

Krevní vzorek s WBC přesahující počet 40×10^3 buněk/ μ l bude před zpracováním vyžadovat naředění pomocí PBS.

Vzorek krve zpracujte nejpozději do 24 hodin po odběru. Vzorek skladujte při laboratorní teplotě (20 – 25°C). Neuchovávejte vzorek v chladničce.

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.	14, 15, 31
Bilirubin (žloutenka) (nekonjugovaný)	Bilirubin může zvýšit fluorescenční pozadí buněk díky své vysoké autofluorescenci.	18, 20, 24
Zbytky buněk (po lýze)	Zbytky buněk mohou poskytovat nepřesné počty buněk a vyčerpat protilátky v zařízení.	17, 21
Erytrocyty	Nedostatečná lýza, červené krvinky přítomné ve vzorku mohou vést k chybnému počítání buněk.	22
Hemoglobin	Hemolyzované vzorky mohou poskytovat chybné výsledky.	19
Lidské anti-myší protilátky	Léčba monoklonálními protilátkami může vést k chybným výsledkům (schopnost vázat se na antigeny buněčného povrchu).	16, 26, 27, 28, 29, 30
Imunoglobuliny	Nelze promývat metodou na jedné platformě a může vést k chybnému počtu podskupin lymfocytů.	17
Revmatoidní faktory	Přítomnost RF interferuje s MIA (multiplexní imunoanalýzy).	23
Triglyceridy	Vysoké cirkulující hladiny lipidů mohou ovlivnit analýzu průtokovou cytometrií určitých populací krevních buněk.	25

Exogenní interference

Vzorek starší než 24 hodin může poskytovat chybné výsledky.

Chlazený vzorek může poskytovat chybné výsledky.

Nesprávná příprava roztoku pro lýzu erytrocytů (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., Kat. č. ED7066 nebo CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, Kat. č. BD303500) může vést k chybným výsledkům. Dodržujte pokyny výrobce pro použití roztoku pro lýzu erytrocytů.

10. Postup

Příprava reagensií

Není nutná žádná příprava reagensie.

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

Použijte reagensii přímo z původního obalu. Doba, po kterou je reagensie používána (vystavena světlu a zvýšené teplotě), nesmí přesáhnout 4 hodiny denně.

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

UPOZORNĚNÍ: Reagensii neředěte.

Příprava nutných, ale neposkytovaných materiálů

Podle pokynů výrobce nařeďte koncentrovaný lyzační roztok na pracovní roztok deionizovanou vodou. Pracovní roztok (1X) je stabilní po dobu 1 měsíce při skladování v dávkovači kapalin nebo uzavřené nádobě při laboratorní teplotě.

Kontrola kvality

Použijte Streck CD-Chex Plus® nebo ekvivalentní kontrolní materiál, abyste ověřili správnou funkci prostředku. Streck CD-Chex Plus® poskytuje stanovené hodnoty relativního a absolutního počtu T buněk, B buněk, granulocytů, monocytů a NK buněk, včetně dvou klinicky relevantních hladin CD4+ buněk.

Obarvěte kontrolní buňky pomocí KOMBITEST T Cell 4-color podle postupu, jak je uvedeno v návodu k použití. Ověřte, že získané výsledky (počty pozitivních buněk) jsou v očekávaném rozsahu uvedeném pro použitou šarži kontrolního materiálu.

Značení vzorku

1. Označte každou testovací zkumavku 12 x 75 mm s kulatým dnem identifikačním údajem vzorku.
2. Pipetujte 20 µl KOMBITEST T Cell 4-color na dno testovací zkumavky 12 x 75 mm s kulatým dnem.
3. Pipetujte 50 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno zkumavky.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud stopy nebo kapky krve ulpí na stěně zkumavky, nemusí být obarveny reagensií nebo nemusí dojít k lýzi erytrocytů a výsledek testu nemusí být platný.

4. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkumavku po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
5. Přidejte 500 µl pracovního roztoku lyzačního činidla (1X) do testovací

zkumavky.

6. Vortexujte a následně inkubujte testovací zkumavku po dobu 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě.

Obarvený vzorek ihned měřte průtokovým cytometrem. V případě, že obarvený vzorek nebude okamžitě změřen, uchovávejte v temnu při 2-8 °C a analyzujte do 24 hodin.

UPOZORNĚNÍ: Bezprostředně před akvizicí průtokovým cytometrem vzorek vortexujte, aby se zabránilo tvorbě agregátů.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s prostředkem KOMBITEST T Cell 4-color 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.

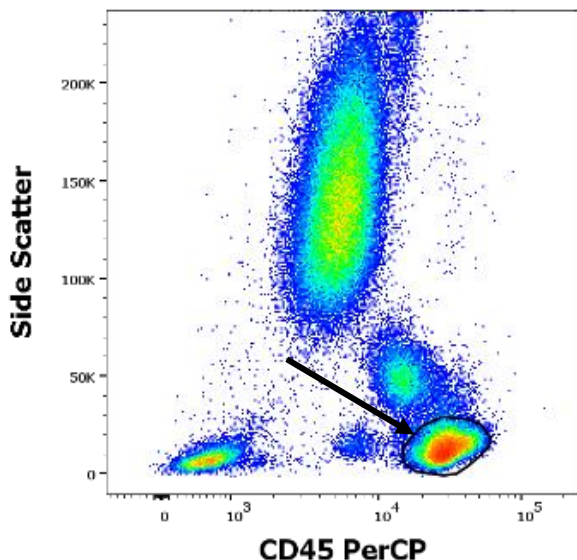
Kompenzujte fluorescenční signály mezi detektory před nebo po sběru dat. Pokud jsou fluorescenční signály nesprávně kompenzovány nebo pokud jsou regiony (gates) umístěny nepřesně, mohou být data nesprávně interpretována.

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 KOMBITEST T Cell 4-color

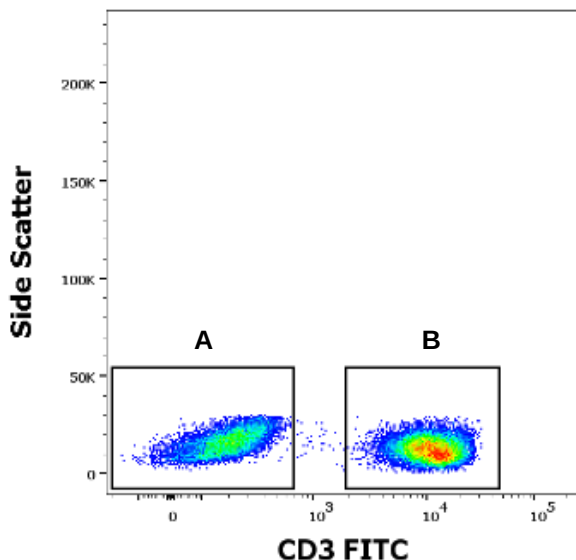
Naměřená kompenzovaná data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus CD45 PerCP. Ohraničte populaci CD45+ lymfocytů, jak je znázorněno na obrázku 1.

Obrázek 1 Ohraničení CD45+ lymfocytů
(data získaná na cytometru BD FACSCanto™ II)



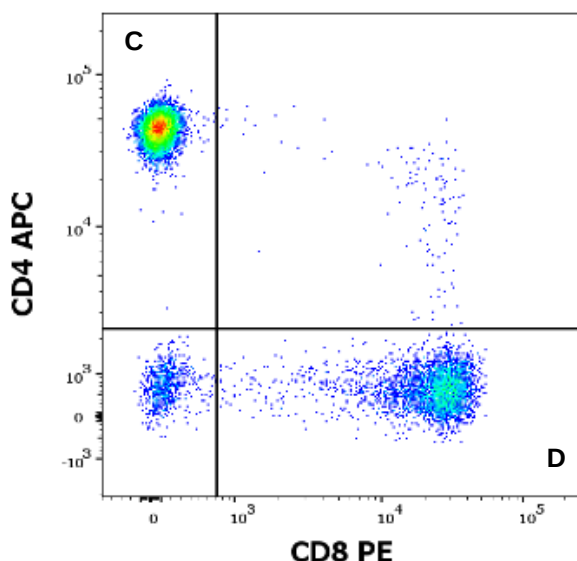
Poté zobrazte ohraničené CD45+ lymfocyty v grafu side-scatter (SSC) versus CD3 FITC, jak je znázorněno na obrázku 2. Rozdělte CD3+ a CD3- lymfocyty pomocí vhodně nastavených regionů (gatů). Vypočítejte procentuální zastoupení T-lymfocytů (CD3+; oblast B na obrázku 2) ze všech lymfocytů.

Obrázek 2 Rozdělení CD3+ a CD3- lymfocytů
(data získaná na cytometru BD FACSCanto™ II)



Zobrazte T-lymfocyty (CD3+; oblast B na obrázku 2) v grafu CD4 APC versus CD8 PE, jak je zobrazeno na obrázku 3. Nastavte vhodný region (gate) a vypočítejte procentuální zastoupení pomocných/induktorových T-lymfocytů (CD4+CD8-; oblast C na obrázku 3) a supresorových/cytotoxických T-lymfocytů (CD4-CD8+; oblast D na obrázku 3) ze všech lymfocytů.

Obrázek 3 CD3+ lymfocyty v dot-plot CD4 APC vs. CD8 PE
(data získaná na cytometru BD FACSCanto™ II)



Výpočet a interpretace analytických výsledků

Pro získání absolutních počtů použijte absolutní početní zastoupení lymfocytů stanovené hematologickým analyzátozem. Postupujte podle pokynů výrobce hematologického analyzátozu. Pro výpočet absolutního počtu požadované subpopulace lymfocytů použijte níže uvedenou rovnici.

$$A \times \frac{B (\%)}{100 (\%)} = \text{Absolutní početní zastoupení požadované subpopulace lymfocytů}$$

A = absolutní početní zastoupení lymfocytů

(data z hematologického analyzátozu; buněk / μ l)

B = relativní početní zastoupení požadované subpopulace lymfocytů ze všech lymfocytů (data z průtokového cytometru; %)

11. Vlastnosti analytické funkce

Specifická

Monoklonální protilátka TB3 rozpoznává CD3 antigen TCR/CD3 komplexu. Specifická protilátka byla potvrzena na HCDM Council (HLDA XI workshop).

Monoklonální protilátka MEM-241 rozpoznává CD4 antigen (povrchový glykoprotein T buněk CD4). Specifická protilátka byla potvrzena na HCDM Council (HLDA VIII workshop).

Monoklonální protilátka LT8 rozpoznává CD8 antigen (disulfidicky vázaný dimer exprimovaný jako dva homodimery CD8 alfa řetězce nebo heterodimery CD8 alfa/beta řetězce). Specifická protilátka byla potvrzena na HLDA workshopech (workshop HLDA V ⁽¹²⁾ a workshop HLDA VII ⁽⁶⁾).

Monoklonální protilátka MEM-28 rozpoznává všechny leukocytární izoformy CD45 (receptorová protein tyrozin fosfatáza typu C). Specifická protilátka byla potvrzena workshopem HLDA (dílna HLDA III ⁽⁸⁾).

Přesnost

Přesnost prostředku byla na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II naměřena a stanovena porovnáním prostředku KOMBITEST T Cell 4-color s podobným výrobkem dostupným na trhu KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, Kat. č. ED7733) paralelním barvením 60 zdravých dárců.

Přesnost metody na průtokových cytometrech Beckman Coulter DxFLEX a Sysmex XF-1600™ byla stanovena porovnáním výsledků analýzy stejných krevních vzorků 37 zdravých dárců obarvených prostředkem KOMBITEST T Cell 4-color a analýzou na průtokových cytometrech BC DxFLEX a BD FACSCanto™ II a na průtokových cytometrech Sysmex XF-1600™ a BD FACSCanto™ II.

Přesnost metody byla podpořena paralelním barvením 104 pacientů (viz tabulka 7) s podezřením na patologický stav imunitního systému. Parametry lineární regresní analýzy jsou uvedeny v tabulkách 4–7.

Tabulka 4 Lineární regresní analýza pro jednotlivé subpopulace lymfocytů u zdravých dárců (srovnání prostředku KOMBITEST T Cell 4-color s IVD produktem KOMBITEST TBNK 6-color (EXBIO, Kat. č. ED7733))

Subpopulace lymfocytů	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	R ²
CD3+	%	60	0,9956	+0,0071	0,9906
	buněk/μl	60	1,0026	4,1341	0,9983
CD3+CD8+	%	60	0,9522	-0,0003	0,9792
	buněk/μl	60	0,9375	6,8895	0,9878
CD3+CD4+	%	60	0,9677	0,0259	0,9708
	buněk/μl	60	1,0198	10,174	0,9875

n = počet krevních vzorků

Tabulka 5 Lineární regresní analýza pro jednotlivé subpopulace lymfocytů u zdravých dárců (srovnání prostředku ED7734 na Beckman Coulter DxFLEX s BD FACSCanto™ II)

Přesnost měření ED7734 na Beckman Coulter DxFLEX					
Beckman Coulter DxFLEX průtokový cytometr vs. BD FACSCanto™ II průtokový cytometr					
Přesnost měření					
Subpopulace lymfocytů	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	R ²
CD3+	%	37	1,0207	0,0188	0,9678
	buněk/μl	37	1,0009	8,4158	0,9968
CD3+CD8+	%	37	1,0241	0,0016	0,9955
	buněk/μl	37	1,0242	3,0245	0,9986
CD3+CD4+	%	37	0,9644	0,0045	0,9719
	buněk/μl	37	0,9479	21,0470	0,9884

n = počet krevních vzorků

Tabulka 6 Lineární regresní analýza pro jednotlivé subpopulace lymfocytů u zdravých dárců (srovnání prostředku ED7734 na Sysmex XF-1600™ s BD FACSCanto™ II)

Přesnost měření ED7734 na Sysmex XF-1600™					
Sysmex XF-1600™ průtokový cytometr vs. BD FACSCanto™ II průtokový cytometr					
Přesnost měření					
Subpopulace lymfocytů	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	R²
CD3+	%	37	1,0297	0,0135	0,9766
	buněk/μl	37	1,0151	5,7134	0,9977
CD3+CD8+	%	37	1,0305	0,0140	0,9853
	buněk/μl	37	0,9921	9,6954	0,9927
CD3+CD4+	%	37	0,9752	0,0151	0,9845
	buněk/μl	37	0,9883	17,9040	0,9953

n = počet krevních vzorků

Tabulka 7 Lineární regresní analýza pro jednotlivé subpopulace lymfocytů u pacientů s podezřením na patologický stav imunitního systému (srovnání prostředku KOMBITEST T Cell 4-color s AQUIOS CL Flow Cytometry System - Beckman Coulter, Inc. a akreditovanou klinickou laboratorní „in house“ metodou – směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek od různých výrobců s analýzou na cytometru BD FACSCanto™ II)

Subpopulace lymfocytů	Jednotky	n	Směrnice	Intercept	R²
CD3+	%	104	0,944	3,774	0,98
	buněk/μl	104	0,927	0,123	0,96
CD3+CD8+	%	104	0,944	1,727	0,99
	buněk/μl	104	0,911	0,071	0,98
CD3+CD4+	%	104	1,005	0,316	0,99
	buněk/μl	104	1,009	0,013	0,99

n = počet krevních vzorků

Linearita

Linearita prostředku byla ověřena na 10 sériových ředěních vzorku krve obohaceného o leukocyty (buffy coat). Vzorky buněk byly značeny pomocí KOMBITEST T Cell 4-color v hexaplikátech. Vzorky byly analyzovány průtokovými cytometry BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFLEX a Sysmex XF-1600™. Naměřená data ukazují, že uvedené subpopulace lymfocytů jsou lineární v rozsahu koncentrace lymfocytů 40 - 10546 buněk/μl u cytometru BD FACSCanto™ II, 15 - 10519 buněk/μl u cytometru Beckman Coulter DxFLEX a 45 - 11892 buněk/μl u cytometru Sysmex XF-1600™. V tabulkách 8 a 10 jsou uvedeny rozsahy koncentrací pro jednotlivé subpopulace buněk.

Tabulka 8 Lineární rozsahy subpopulací lymfocytů analyzované pomocí BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	
Subpopulace lymfocytů	Rozsah (buněk/μl)
CD3+	31 - 7302
CD3+CD8+	9 - 2182
CD3+CD4+	17 - 4080

Tabulka 9 Lineární rozsahy subpopulací lymfocytů analyzované pomocí Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX	
Subpopulace lymfocytů	Rozsah (buněk/μl)
CD3+	10 - 7268
CD3+CD8+	3 - 2297
CD3+CD4+	6 - 3940

Tabulka 10 Lineární rozsahy subpopulací lymfocytů analyzované pomocí Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™	
Subpopulace lymfocytů	Rozsah (buněk/μl)
CD3+	33 – 7386
CD3+CD8+	12 - 2792
CD3+CD4+	19 - 4179

Limit detekce / Limit kvantifikace / Cut-off test

Data z linearity byla použita ke stanovení limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ).

Limit detekce byl stanoven jako nejnižší nenulová absolutní hodnota počtu buněk plus $3 \times \text{SD}$ (standardní odchylka) pro každou podskupinu lymfocytů (viz tabulky 11 – 13).

Limit kvantifikace byl uveden jako nejnižší hodnota v rozsahu linearity koncentrací analytu prezentovaný jako absolutní počet subpopulace lymfocytů, při kterém CV z hexaplikátů nepřesáhlo 10 % a výtěžnost byla v rozmezí 90 % - 110 % (viz tabulky 11 – 13).

Výsledky testu nejsou vázané na jednoznačnou diagnózu, proto nelze odhadnout Cut-off.

Tabulka 11 Limity detekce a kvantifikace na cytometru BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II				
Subpopulace lymfocytů	Nejnižší nenulový počet buněk (buněk/ μl)	$3 \times \text{SD}$ (SD)	LOD (buněk/ μl)	LOQ (buněk/ μl)
CD3+	1	0,6 (0,2)	1,6	3
CD3+CD8+	1	0,6 (0,2)	1,6	9
CD3+CD4+	1	0,6 (0,2)	1,6	2

Tabulka 12 Limity detekce a kvantifikace na cytometru Beckman Coulter DxFLEx

Beckman Coulter DxFLEx				
Subpopulace lymfocytů	Nejnižší nenulový počet buněk (buněk/ μl)	$3 \times \text{SD}$ (SD)	LOD (buněk/ μl)	LOQ (buněk/ μl)
CD3+	1	0,3 (0,1)	1,3	3
CD3+CD8+	1	0,6 (0,2)	1,6	3
CD3+CD4+	2	0,6 (0,2)	2,6	6

Tabulka 13 Limity detekce a kvantifikace na cytometru Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™				
Subpopulace lymfocytů	Nejnižší nenulový počet buněk (buněk/ μl)	$3 \times \text{SD}$ (SD)	LOD (buněk/ μl)	LOQ (buněk/ μl)
CD3+	1	0,3 (0,1)	1,3	1
CD3+CD8+	2	2,7 (0,9)	4,7	4
CD3+CD4+	1	0,6 (0,2)	1,6	2

Opakovatelnost

Opakovatelnost prostředku byla naměřena na deseti vzorcích krve v hexaplikátech. Vzorky byly analyzovány průtokovými cytometry BD FACSCanto™ II, Beckman Coulter DxFLEX a Sysmex XF-1600™. Variační koeficienty (CV) jsou uvedeny v tabulkách níže (Tabulka 14 a 16).

Tabulka 14 Opakovatelnost prostředku na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Subpopulace lymfocytů	Jednotky	n	Průměr	SD	% CV
CD3+	%	10	69,27	0,34	0,51
	buněk/μl	10	1408	7,3	
CD3+CD8+	%	10	22,40	0,23	1,16
	buněk/μl	10	449	4,7	
CD3+CD4+	%	10	42,21	0,28	0,68
	buněk/μl	10	864	6,0	

n = počet krevních vzorků

Tabulka 15 Opakovatelnost prostředku na průtokovém cytometru Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX					
Subpopulace lymfocytů	Jednotky	n	Průměr	SD	% CV
CD3+	%	10	68,26	0,43	0,67
	buněk/μl	10	1389	10,1	
CD3+CD8+	%	10	22,61	0,23	1,15
	buněk/μl	10	454	4,6	
CD3+CD4+	%	10	41,04	0,45	1,09
	buněk/μl	10	842	10,1	

n = počet krevních vzorků

Tabulka 16 Opakovatelnost prostředku na průtokovém cytometru Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™					
Subpopulace lymfocytů	Jednotky	n	Průměr	SD	% CV
CD3+	%	10	71,77	0,54	0,78
	buněk/μl	10	1275	9,6	
CD3+CD8+	%	10	26,39	0,24	0,90
	buněk/μl	10	474	4,4	
CD3+CD4+	%	10	41,12	0,48	1,14
	buněk/μl	10	723	8,5	

n = počet krevních vzorků

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost prostředku na cytometrech BD FACSCanto™ II a Beckman Coulter DxFLEx byla měřena na 2 stabilizovaných vzorcích krve (CD Chex Plus® a CD-Chex Plus® CD4 Low od STRECK). Reprodukovatelnost prostředku na cytometru Sysmex XF-1600™ byla měřena na 2 stabilizovaných vzorcích krve (IMMUNO-TROL Low Cells a IMMUNO-TROL Cells od Beckman Coulter). Vzorky byly měřeny při stejných podmínkách po dobu 15 dnů za použití 3 šarží prostředku (každá 5 dní). Variační koeficienty (CV) jsou uvedeny v tabulkách níže (Tabulka 17 - 19).

Tabulka 17 Reprodukovatelnost prostředku na průtokovém cytometru
BD FACSCanto™ II

Subpopulace lymfocytů	Materiál	Jednotky	Průměr	SD	% CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76,60	0,35	0,45
		buněk/μl	1888	8,5	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60,07	0,40	0,67
		buněk/μl	872	5,8	
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23,68	0,24	1,03
		buněk/μl	584	6,0	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42,19	0,28	0,67
		buněk/μl	612	4,1	
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	48,99	0,37	0,75
		buněk/μl	1209	9,0	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12,77	0,26	2,03
		buněk/μl	185	3,8	

Tabulka 18 Reprodukovatelnost prostředku na průtokovém cytometru Beckman Coulter
DxFLEX

Subpopulace lymfocytů	Materiál	Jednotky	Průměr	SD	% CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76,67	0,44	0,58
		buněk/μl	1891	10,9	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60,36	0,39	0,64
		buněk/μl	876	5,63	
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23,79	0,32	1,34
		buněk/μl	567	7,85	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42,91	0,36	0,84
		buněk/μl	623	5,21	
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	48,70	0,40	0,83
		buněk/μl	1201	9,95	
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12,59	0,21	1,65
		buněk/μl	183	3,02	

Table 19 Reproducibility of the device on Sysmex XF-1600™

Subpopulace lymfocytů	Materiál	Jednotky	Průměr	SD	% CV
CD3+	IMMUNO-TROL Cells	%	71,77	0,66	0,92
		buněk/μl	755	6,9	
	IMMUNO-TROL Low Cells	%	55,05	0,45	0,82
		buněk/μl	483	4,0	
CD3+CD8+	IMMUNO-TROL Cells	%	24,87	0,55	2,20
		buněk/μl	262	5,8	
	IMMUNO-TROL Low Cells	%	41,41	0,59	1,43
		buněk/μl	363	5,2	
CD3+CD4+	IMMUNO-TROL Cells	%	42,62	0,57	1,33
		buněk/μl	448	6,0	
	IMMUNO-TROL Low Cells	%	9,72	0,35	3,62
		buněk/μl	85	3,1	

POZNÁMKA: Všechna data pro hodnocení vlastností analytické funkce byla měřena za použití lyzačního roztoku EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Kat. č. ED7066).

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

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

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

Pacienti se získanou imunodeficiencí

Klinická data byla shromážděna pro 53 pacientů s potvrzenou infekcí virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV - Human Immunodeficiency Virus). Klinická funkce prostředku ED7734 byla stanovena srovnáním prostředku KOMBITEST T Cell 4-color v kombinaci s lyzačním roztokem EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Kat. č. ED7066) s akreditovanou klinickou laboratorní „in-house“

metodou (směs fluorescenčně značených monoklonálních protilátek od různých výrobců s analýzou na cytometru BD FACSCanto™ II).

Výsledky posouzení imunitního stavu pacienta byly hodnoceny s ohledem na přítomnost imunodeficience (Tabulka 20).

Tabulka 20 Klinická funkce prostředku KOMBITEST T Cell 4-color – HIV pacienti

		Imunitní stav pacienta stanoven akreditovanou klinickou laboratorní metodou	
		Imunodeficience	Normální stav
Imunitní stav pacienta stanoven prostředkem KOMBITEST T Cell 4-color	Imunodeficience	28 z 29 pacientů*	0 pacientů
	Normální stav	0 pacientů	24 pacientů

UPOZORNĚNÍ:

*Prostředek KOMBITEST T Cell 4-color nedokázal obarvit antigen CD3 na T-lymfocytech u jednoho (1) HIV pacienta v kritickém zdravotním stavu.

13. Očekávané hodnoty

Referenční interval

Tabulka 21 Referenční intervaly zdravých dárců krve měřené na přístroji BD FACSCanto™ II

Subpopulace lymfocytů	n	Jednotka	Rozsah		Průměr
			Min	Max	
CD3+	97	%	51,5	87,1	72,3
	97	buněk/μl	766	2864	1383
CD3+CD8+	97	%	10,1	47,2	23,9
	97	buněk/μl	132	1307	442
CD3+CD4+	97	%	23,8	59,5	41,8
	97	buněk/μl	393	1337	798

n = počet krevních vzorků

Referenční intervaly uvedené v tabulce 21 byly stanoveny na zdravých pacientech, kteří byli podle legislativy ČR považováni za dárce krve splněním přísných kritérií pro dárce krve pro krevní banku. Data byla měřena na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II.

Konkrétní referenční rozmezí se mohou lišit v závislosti na regionu a populaci, na které byly hodnoty stanoveny. Z tohoto důvodu si laboratoře musí stanovit vlastní normální referenční rozmezí pro subpopulace lymfocytů identifikované pomocí KOMBITEST T Cell 4-color z místní populace normálních dárců vzhledem k odchylkám hodnot souvisejících s věkem, pohlavím, klinickými charakteristikami a etnickou příslušností.

14. Omezení

Prostředek KOMBITEST T Cell 4-color nebyl validován pro určování relativních a absolutních počtů při použití ve vzorcích odebraných s heparinem nebo roztokem ACD (Acid Citrat Dextrose) sloužícím jako antikoagulant.

Prostředek KOMBITEST T Cell 4-color není určen ke screeningu a/nebo fenotypizaci leukemických a lymfomických vzorků.

Absolutní počty nejsou srovnatelné mezi laboratořemi používajícími různá zařízení od různých výrobců.

15. Odkazy

- 1) Bensussan. A et al. Significant enlargement of a specific subset of CD3+CD8+ peripheral blood leukocytes mediating cytotoxic T-lymphocyte activity during human immunodeficiency virus infection. Proc Natl Acad Sci U

- S A. 1993 15;90(20):9427-30. doi: 10.1073/pnas.90.20.9427.
- 2) Boldt. A et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry B Clin Cytom* 2014 May;86(3):191-206. doi:10.1002/cyto.b.21162.
 - 3) de Saint Basile. G et al. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1512-7. doi: 10.1172/JCI22588.
 - 4) Giorgi. J V. Characterization of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Mar 20;677:417-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38803.x.
 - 5) Li. Y et al. AIDS prevention and control in the Yunnan region by T cell subset assessment. *PLoS One*. 2019 Apr 18;14(4):e0214800. doi: 10.1371/journal.pone.0214800
 - 6) Mason. D et al. eds.: *Leucocyte Typing VII: White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Seventh International Workshop and Conference Held in Harrogate*. United Kindom: Oxford University Press; 2002.
 - 7) McCarty. B et al. Low Peripheral T Follicular Helper Cells in Perinatally HIV-Infected Children Correlate With Advancing HIV Disease. *Front Immunol*. 2018 Aug 24;9:1901. doi: 10.3389/fimmu.2018.01901.
 - 8) McMichael AJ. ed. *Leucocyte Typing III: 54 White Cell Differentiation Antigens*. New York. NY: Oxford University Press; 1987.
 - 9) Monafu. W J et al. A hereditary immunodeficiency characterized by CD8+ T lymphocyte deficiency and impaired lymphocyte activation. *Clin Exp Immunol*. 1992 Dec;90(3):390-3. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05856.x.
 - 10) North. M E et al. Primary defect in CD8+ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN-gamma) in CD28+ ('cytotoxic') and CD28- ('suppressor') CD8+ subsets. *Clin Exp Immunol*. 1998 Jan;111(1):70-5. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00479.x.
 - 11) Picat. M Q et al. T-cell activation discriminates subclasses of symptomatic primary humoral immunodeficiency diseases in adults. *BMC Immunol*. 2014 Mar 12;15:13. doi: 10.1186/1471-2172-15-13.
 - 12) Schlossman SF. Boumsell L. Gilks W. et al. eds.: *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York. NY: Oxford University Press; 1995.
 - 13) van Dongen. J J M et al. EuroFlow-Based Flowcytometric Diagnostic Screening and Classification of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. *Front Immunol*. 2019 Jun 13;10:1271. doi: 10.3389/fimmu.2019.01271.
 - 14) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev*. 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.

- 15) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
- 16) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: *Clin Chem* 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
- 17) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.
- 18) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x
- 19) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.
- 20) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem.* 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
- 21) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
- 22) Hervé Lecoœur, Marie-Lise Gougeon, Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes, *Journal of Immunological Methods*, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 23) Bartels EM, Falbe Wätjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis.* 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
- 24) XUE Yan, XU Li, DANG Liheng, WANG Chao, CUI Yaqiong, WANG Ping, WANG Ning, ZHANG Xinjie, LIU Yang. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2022, 37(12): 1169-

- 25) van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, et al. (2012) Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE* 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>
- 26) Yasmine Van Caeneghem, Stijn De Munter, Paola Tieppo, Glenn Goetgeluk, Karin Weening, Greet Verstichel, Sarah Bonte, Tom Taghon, Georges Leclercq, Tessa Kerre, Reno Debets, David Vermijlen, Hinrich Abken & Bart Vandekerckhove (2017) Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities, *Oncolmunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460
- 27) Lamia Achour, Mark G. H. Scott, Hamasseh Shirvani, Alain Thuret, Georges Bismuth, Catherine Labbé-Jullié, Stefano Marullo; CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009; 113 (9): 1938–1947. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141275>
- 28) A. Stronkhorst, G. N. J. Tytgat & S. J. H. Van Deventer (1992) CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27:sup194, 61-65, DOI: 10.3109/00365529209096029
- 29) Zinzani, P.L., Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 177–190 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>
- 30) Whiteman KR, Johnson HA, Mayo MF, Audette CA, Carrigan CN, LaBelle A, Zukerberg L, Lambert JM, Lutz RJ. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small cell lung cancer in human xenograft models. *MAbs*. 2014 Mar-Apr;6(2):556-66. doi: 10.4161/mabs.27756. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24492307; PMCID: PMC3984343.
- 31) J Frengen, B Kierulf, R Schmid, T Lindmo, K Nustad, Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, *Clinical Chemistry*, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>.

16. 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™, BD Multitest™ a FlowJo™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson and Company. CD-Chex Plus® je registrovaná ochranná známka firmy Streck. Cy™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytiva. Sysmex XN-1000™ a Sysmex XF-1600™ jsou registrované ochranné známky firmy Sysmex Corporation. VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry. Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L..

18. Historie revizí

Verze 3, ED7734_IFU_v3

Oprava textu v části " Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem".

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.