

exbio

CD34 QuantiFlowEx Kit

50 testów | Nr kat. ED7080

IVD **CE** 2265

Instrukcja użycia (PL)

Wersja: ED7080_IFU_v5_PL

Data wydania: 24-10-2024

Symbole stosowane w oznakowaniu urządzeń

IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Ograniczenie temperatury
CE 2265	Znak zgodności CE Numer identyfikacyjny organu notyfikowanego		Przechowywać poza zasięgiem światła słonecznego
	Producent		Utrzymywać w suchości Chronić przed deszczem
UDI	Unikalny identyfikator urządzenia		Ostrzeżenie
	Zapoznaj się z instrukcją użycia	CONC 10x	Skoncentrowany roztwór (10x)
	Zawiera ilość wystarczającą na <n> testów	CONTENTS	Zawartość
REF	Numer katalogowy	UK CA	Znak UKCA
LOT	Kod partii		
	Termin przydatności do użycia		

1. Przeznaczenie

Zestaw CD34 QuantiFlowEx jest przeznaczony do wykrywania i zliczania całkowitej liczby żywotnych hematopoetycznych komórek macierzystych z całkowitej liczby żywych leukocytów w próbkach ludzkiej krwi i tkanek metodą cytometrii przepływowej.

Co jest wykrywane i/lub mierzone

Urządzenie CD34 QuantiFlowEx Kit wykrywa i mierzy względne wartości procentowe i bezwzględne liczby żywych ludzkich hematopoetycznych komórek macierzystych (CD34+CD45dim).

Funkcja urządzenia

Urządzenie przeznaczone jest do monitorowania liczby hematopoetycznych komórek macierzystych we krwi obwodowej, szpiku kostnym oraz produkcji leukaferezy.

Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego

Dokładne zliczenie liczby hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC) w ludzkiej krwi i próbkach tkanek lub przeszczepach do przeszczepu jest niezbędne do postępowania z pacjentem lub przetwarzania przeszczepu ⁽¹⁾.

Rodzaj testu

Nie zautomatyzowany

Ilościowy

Wymagany rodzaj próbki

Normalna krew obwodowa lub zmobilizowana krew obwodowa lub produkt(y) leukaferezy lub szpik kostny.

Populacja testowa

Nie jest przeznaczony dla określonej populacji.

2. Użytkownik

Urządzenie jest przeznaczone wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego. Nie służy do badań przyłóżkowych, ani do samodzielnych badań.

Wymagania dotyczące kwalifikacji

Docelowy użytkownik powinien posiadać najnowszą wiedzę specjalistyczną w zakresie analizy cytometrii przepływowej komórek ludzkich, standardowych technik laboratoryjnych, w tym umiejętności pipetowania oraz bezpiecznego i właściwego obchodzenia się z próbkami pobranymi z organizmu ludzkiego.

Przewidziany użytkownik musi przestrzegać normy EN ISO 15189 lub innych norm krajowych, w stosownych przypadkach.

3. Zasada testu

Zasada testu opiera się na wykrywaniu przeciwciała monoklonalnego wiążącego się ze specyficzną cząsteczką (antygenem) ekspresjonowaną przez określone ludzkie krwinki. Przeciwciała monoklonalne użyte w teście są znakowane różnymi fluorochromami, które są wzbudzane wiązką laserową z cytometru przepływowego podczas pobierania próbki krwi barwionej przeciwciałami. Późniejsza fluorescencja (emisja światła) każdego fluorochromu obecnego w pobranej komórce krwi jest zbierana i analizowana przez urządzenie. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do gęstości ekspresji antygenu w komórce, co pozwala na rozdzielenie różnych podzbiorów komórek.

7-AAD jest barwnikiem nieprzepuszczalnym dla błony komórkowej, który jest wykluczony z żywych komórek i wiąże się z DNA w komórkach martwych. Różnice w intensywności fluorescencji komórek umożliwiają wykluczenie z analizy komórek niezdolnych do życia.

4. Dostarczone odczynniki / dostarczony odczynnik

Zawartość

Urządzenie CD34 QuantiFlowEx Kit wystarcza na 50 testów i jest dostarczane z następującymi odczynnikami:

Staining Reagent (ED7080-1; 1 fiołka) zawierający 1 ml wstępnie wymieszanej kombinacji przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromem CD45 FITC i CD34 PE, rozcieńczonych do optymalnych stężeń w stabilizującym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) zawierającym 15 mM azydek sodu, patrz Tabela 1.

7-AAD (ED7080-2; 1 fiołka) zawierający 1 ml 7- Barwnik żywotności komórek aminoaktynomycyny D (7-AAD), rozcieńczony w optymalnym stężeniu w stabilizującym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) zawierającym 15 mM azydek sodu.

Lysing Solution (ED7080-3; 1 butelka) zawierający 15 ml stężonego (10X) buforowanego roztworu na bazie chlorku amonu, wolnego od utrwalaczy.

Skład

Tabela 1 Opis i stężenia składników aktywnych

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

5. Materiały wymagane, ale niedostarczone

Zarówno dla metody pojedynczej, jak i podwójnej platformy

Probówki okrągłodenne (12 x 75 mm)

Woda dejonizowana (do odczynników)

Komórki kontroli procesu (Streck CD-Chex CD34[®], kontrola CD34 – 3 poziomy, nr kat. 213337, 213347, 213383 lub równoważna kontrola komórek ulegających lizie z wcześniej określoną liczbą HSC CD34)

Tylko dla metody pojedynczej platformy

Standard liczby komórek fluorescencyjnych

- do użytku z cytometrami Becton Dickinson
 - o Probówki BD Trucount™
- do użytku z cytometrami Beckman Coulter
 - o Kulki fluorescencyjne Beckman Coulter Flow-Count™

6. Wymagany sprzęt

Zarówno dla metody pojedynczej, jak i podwójnej platformy

Pipeta automatyczna z jednorazowymi końcówkami (20 - 100 µl) do pipetowania próbek i odczynników

Dozownik lub pipeta do płynów z jednorazowymi końcówkami (2 ml) do dozowania roztworu do lizy erytrocytów

Perłki do liczenia (probówki TruCount™ (BD Biosciences; ref. nr 663028), FlowCount Fluorospheres (Beckman Coulter; ref. nr 7547053)

Mieszadło wirowe

Cytometr przepływowy z jednym laserowym źródłem wzbudzenia (488 nm), detektorami światła rozproszonego, filtrami optycznymi i detektorami emisji odpowiednimi do zbierania sygnałów z fluorochromów przedstawionych w tabeli 2.

Tabela 2 Charakterystyka widmowa fluorochromów zastosowanych w urządzeniu

Fluorochrom	Wzbudzenie [nm]	Emisja [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
7-AAD	488	670

UWAGA: Urządzenie przetestowano na cytometrach przepływowych BD FACSCanto™ II i BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios (Beckman Coulter) i XF-1600™ (Sysmex).

Tylko dla metody podwójnej platformy

Analizator hematologiczny (do bezwzględnego zliczania krwinek) zdolny do oznaczania liczby białych krwinek (WBC) i limfocytów na μl próbki.

7. Magazynowanie

Przechowywać w temperaturze 2–8°C.

Unikać długotrwałej ekspozycji na światło.

Nie zamrażać.

Patrz punkt 10 Procedura (Przygotowanie odczynników), aby uzyskać informacje na temat stabilności podczas użycia i okresu ważności po pierwszym otwarciu, a także warunków przechowywania i stabilności roztworów roboczych (jeśli dotyczy).

8. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia użytkowania

Klasyfikacja zagrożeń GHS

Zapoznaj się z kartą charakterystyki (SDS) dostępną na stronie produktu pod adresem www.exbio.cz, aby uzyskać pełne informacje na temat zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne i mieszaniny zawarte w produkcie oraz jak należy się z nimi obchodzić i jak je utylizować.

Zagrożenie biologiczne

Ludzkie próbki biologiczne i próbki krwi oraz wszelkie materiały mające z nimi kontakt są zawsze uważane za materiały zakaźne.

Stosować środki ochrony osobistej i bezpieczeństwa, aby uniknąć kontaktu ze skórą, oczami i błonami śluzowymi.

Postępuj zgodnie ze wszystkimi obowiązującymi przepisami prawa, regulacjami i procedurami dotyczącymi obchodzenia się z materiałami zakaźnymi i ich usuwania.

Dowody pogorszenia jakości

Normalny wygląd dostarczonego odczynnika to klarowny płyn. Nie używać odczynnika w przypadku zauważenia jakiegokolwiek zmiany w jego wyglądzie, na przykład zmętnienia lub osadu.

Ograniczenie użytkowania

Nie stosować po upływie daty ważności podanej na etykiecie produktu.

9. Próbką

Użyj krwi lub materiału tkankowego pobranego do pojemnika na próbki sklasyfikowanego jako wyrób medyczny, z antykoagulantem EDTA, heparyną lub ACD (kwaśny cytrynian dekstrozy).

Za pomocą urządzenia można analizować następujące próbki:

normalna i zmobilizowana krew obwodowa, produkty leukaferazy i szpik kostny.

UWAGA: W przypadku analizy dwuplatformowej należy określić bezwzględną liczbę leukocytów w pobranej próbce za pomocą analizatora hematologicznego. Sam zestaw CD34 QuantiFlowEx Kit nie zapewnia zliczenia bezwzględnej liczby komórek.

Przetworzyć próbkę krwi nie później, niż 24 godziny po pobraniu.

Interferencja endogenna

Na podstawie badań literatury naukowej w Tabeli 3 przedstawiono endogenne źródła zakłóceń.

Tabela 3 Endogenna interferencja urządzenia

Interferencja endogenna	Wpływ	Odniesienie
Albumina	Albumina w dużych stężeniach może zakłócać działanie urządzenia ze względu na swoją zdolność wiązania i uwalniania dużych ilości ligandów.	2, 3, 4
Bilirubina (żółtaczka) (niesprzężona)	Bilirubina może zwiększać tło fluorescencji komórek ze względu na swoją wysoką autofluorescencję.	5, 6, 7
Pozostałości komórek (po lizie)	Pozostałości komórek mogą powodować niedokładność pomiaru liczby komórek i zmniejszenie ilości przeciwciał w urządzeniu.	8, 9
Erytrocyty	Niewystarczająca liza, obecność czerwonych krwinek w próbce może skutkować błędnym liczeniem komórek.	6
Hemoglobina	Zhemolizowane próbki mogą dawać błędne wyniki.	10
Ludzkie przeciwciała antymysie	Leczenie przeciwciałami monoklonalnymi może dawać błędne wyniki (zdolność wiązania się z antygenami na powierzchni komórki).	11, 12, 13, 14, 15, 16
Immunoglobuliny	Nie można myć i mogą dawać błędne	8

	wyniki pomiaru podzbioru limfocytów.	
Czynniki reumatoidalne	Obecność czynników reumatoidalnych zakłóca wyniki testów MIA (multipleksowych testów immunoenzymatycznych).	17
Triglicerydy	Wysokie stężenie lipidów we krwi może mieć wpływ na wyniki analizy metodą cytometrii przepływowej niektórych populacji komórek krwi.	18

Zakłócenia egzogenne

Próbki starsze niż 24 godziny mogą dawać błędne wyniki.

Próbka przechowywana w lodówce może dawać błędne wyniki.

Nieprawidłowe przygotowanie roztworu do lizy erytrocytów może prowadzić do błędnych wyników. Stosując roztwór do lizy erytrocytów, należy postępować zgodnie z instrukcją producenta.

10. Procedura

Przygotowanie dostarczonych odczynników

Staining Reagent i 7-AAD

Przygotowanie odczynnika nie jest konieczne.

Przed użyciem doprowadzić odczynnik do temperatury pokojowej. Utrzymywać główny pojemnik urządzenia w stanie suchym.

Użyć odczynnika bezpośrednio z jego oryginalnego pojemnika podstawowego.

Po pierwszym otwarciu odczynnik zachowuje swoje właściwości użytkowe do daty ważności, jeśli jest przechowywany w określonych warunkach w oryginalnym pojemniku podstawowym.

OSTRZEŻENIE: Nie rozcieńczać odczynnika.

Lysing Solution

Rozcieńczyć stężony (10X) roztwór do lizy erytrocytów wodą dejonizowaną do roboczego roztworu do lizy (1X).

OSTRZEŻENIE: Roboczy roztwór do lizy (1X) jest stabilny **tylko przez 1 dzień**.

Przygotować świeży roboczy roztwór lizujący (1X) każdego dnia pomiarowego, mieszając 1 część stężonego (10X) roztworu lizującego z 9 częściami wody dejonizowanej i przechowywać w dozowniku cieczy lub zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej.

Przygotowanie wymaganych, ale niedostarczonych materiałów

W celu przygotowania i stosowania wzorców liczby komórek fluorescencyjnych należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta.

Kontrola jakości

Użyć Streck CD-Chex CD34[®] lub równoważnych komórek kontrolnych jako pozytywnej kontroli proceduralnej, aby zapewnić prawidłowe działanie urządzenia zgodnie z przeznaczeniem. Streck CD-Chex CD34[®] dostarcza ustalonych wartości procentowych dodatnich i bezwzględnych zliczeń CD34+ HSC.

Wybarwić komórki kontrolne za pomocą zestawu CD34 QuantiFlowEx, zgodnie z procedurą przetwarzania próbki, jak określono w instrukcji obsługi. Sprawdzić, czy uzyskane wyniki (% komórek dodatnich) mieszczą się w oczekiwanym zakresie podanym dla używanej serii komórek kontrolnych.

Barwienie preparatu – metoda pojedynczej platformy

1. Dla każdej próbki oznaczyć okrągłodenną probówkę o wymiarach 12 × 75 mm odpowiednią identyfikacją próbki.

UWAGA: Użyć próbówki BD Trucount™ jako próbówki do bezwzględnego zliczania komórek macierzystych CD34.

2. Odpipetować 20 µl Staining Reagent na dno próbówki.
3. Odpipetować 20 µl 7-AAD na dno próbówki.
4. Odpipetować 100 µl dobrze wymieszanej próbki na dno próbówki, stosując technikę pipetowania odwrotnego.

OSTRZEŻENIE: Dokładność pipetowania ma kluczowe znaczenie dla zliczania bezwzględnej liczby komórek macierzystych CD34+. Dlatego należy zastosować technikę pipetowania odwrotnego z wykorzystaniem automatycznej pipety z wyporem powietrza.

Aby odwrócić aspirację próbki w pipecie, wcisnąć pokrętkę pipety do drugiego ogranicznika i zaaspirować próbkę. Następnie umieścić końcówkę pipety zawierającą próbkę krwi blisko dna próbówki i wcisnąć pokrętkę pipety do pierwszego ogranicznika, aby pobrać próbkę.

Unikać pipetowania krwi po ścianie próbówki. Jeśli na ścianie próbówki pozostanie rozmaz krwi lub kropla, może ona nie zostać zabarwiona odczynnikami lub erytrocyty mogą nie ulec lizie, przez co wynik testu może być nieważny.

5. Wytrząsać i inkubować probówkę przez 20-30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
6. Dodać do próbówki 2 ml roboczego roztworu lizującego (1X).

7. Wytřząsać i inkubować próbkę przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
8. Jeśli próbka BD Trucount™ nie była używana jako próbka, dodać 100 µl kulek fluorescencyjnych Flow Count™, stosując technikę pipetowania odwróconego. Postępować zgodnie z instrukcjami producenta.
9. Natychmiast pobrać zabarwioną próbkę na cytometr przepływowy. Jeśli zabarwiona próbka nie zostanie pobrana natychmiast, należy zamknąć próbkę, przechowywać w ciemności w temperaturze 2-8°C i poddać analizie w ciągu 2 godzin.

OSTRZEŻENIE: Wirować zabarwioną próbkę bezpośrednio przed akwizycją w cytometrze przepływowym, aby uniknąć tworzenia się agregatów.

Barwienie preparatu – metoda podwójnej platformy (Dual Platform)

OSTRZEŻENIE: Określ bezwzględną liczbę leukocytów w pobranej próbce za pomocą analizatora hematologicznego przed przetwarzaniem próbki.

1. Dla każdej próbki oznaczyć okrągłodenną próbkę o wymiarach 12 × 75 mm odpowiednią identyfikacją próbki.
2. Odpipetować 20 µl Staining Reagent na dno próbki.
3. Odpipetować 20 µl 7-AAD na dno próbki.
4. Odpipetować 100 µl dobrze wymieszanej próbki na dno próbki, stosując technikę pipetowania odwrotnego.
5. Wytřząsać i inkubować próbkę przez 20-30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
6. Dodać do próbki 2 ml roboczego roztworu lizującego (1X).
7. Wytřząsać i inkubować próbkę przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
8. Natychmiast pobrać zabarwioną próbkę na cytometr przepływowy. Jeśli zabarwiona próbka nie zostanie pobrana natychmiast, zakręcić próbkę i przechowywać w ciemności w temperaturze 2-8°C oraz poddać analizie w ciągu 2 godzin.

OSTRZEŻENIE: Wirować zabarwioną próbkę bezpośrednio przed akwizycją w cytometrze przepływowym, aby uniknąć tworzenia się agregatów.

Analiza metodą cytometrii przepływowej

Cytometr przepływowy wybrany do pracy z urządzeniem CD34 QuantiFlowEx Kit należy rutynowo kalibrować, przy użyciu mikrokulek fluorescencyjnych, aby zapewnić stabilną czułość detektorów, zgodnie z zaleceniami producenta cytometru.

W przypadku nieprawidłowej konserwacji cytometr przepływowy może dawać fałszywe wyniki.

Patrz specyfikacje cytometru producenta dotyczące laserów i detektorów fluorescencyjnych, zgodnie z charakterystyką wzbudzenia i emisji fluorochromów w rozdziale 6. Wymagany sprzęt.

Ustawić napięcia na odpowiednich detektorach fluorescencyjnych przed analizą zabarwionej próbki. Napięcie na detektorze PMT powinno być ustawione na tyle wysoko, aby jak najmniej zdarzeń wybarwionych ujemnie zakłócało kanał 0 na osi fluorescencji. Również napięcie detektora PMT nie powinno przekraczać wartości, przy których dodatkowo zdarzenia są dociskane do prawej osi.

W zależności od próbki należy zarejestrować co najmniej 300 000 – 1 000 000 zdarzeń na próbówkę.

Zawsze zbieraj parametry rozproszenia światła komórki: Rozproszenie światła pod kątem do przodu (zarówno obszar sygnału, jak i wysokość sygnału) oraz boczne (prostopadłe) rozproszenie światła (zarówno obszar sygnału, jak i wysokość sygnału).

W przypadku metody **Single Platform** ustaw próg fluorescencji w detektorze FITC zamiast wielkości zdarzenia do zbierania danych. Proóg rozproszenia w przód (wielkość zdarzenia) może wykluczyć z analizy zdarzenia dotyczące mikrocząstek standardu zliczania, które mogłyby negatywnie wpłynąć na zliczenie procentowe komórek macierzystych CD34+.

Dla metody **Dual Platform** ustaw próg na Forward Scatter (rozproszenie w przód).

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

UWAGA: Do przygotowania kontroli z kompensacją 7-AAD należy użyć próbek o spodziewanej niskiej żywotności komórek, np. komórki krwi przetworzone roztworem lizującym na bazie formaldehydu. Próbkę o wysokiej żywotności komórek zapewniają niską liczbę martwych komórek. Niska liczba martwych komórek może negatywnie wpływać na średnią intensywność fluorescencji martwych komórek 7-AAD i może powodować niewystarczającą kompensację.

Do analizy danych pomiarowych można wykorzystać oprogramowanie cytometryczne opracowane przez producenta lub oprogramowanie dedykowane

do analizy danych cytometrycznych offline (np. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analiza danych wybarwionej próbki z zestawu CD34 QuantiFlowEx

Analizuj zmierzone i skompensowane dane za pomocą odpowiedniego oprogramowania. Protokół bramkowania Międzynarodowego Towarzystwa Hematoterapii i Inżynierii Przeszczepów (ISHAGE) (rys. 1-5) stosuje się do oznaczenia odsetka żywych komórek macierzystych CD34+.

Stosując 5 parametrów (2 parametry rozpraszania światła i 3 parametry fluorescencyjne) hematopoetyczne komórki macierzyste CD34+ identyfikuje się przez kombinację bramkowania sekwencyjnego i logicznego, zgodnie z ich właściwościami.

Prawdziwe komórki macierzyste CD34+ wykazują ekspresję antygenów CD34 i CD45, jednak ekspresja CD45 jest podobna do ekspresji komórek blastycznych. Intensywność wybarwienia jest wykrywalna, ale mniejsza niż np. w limfocytach.

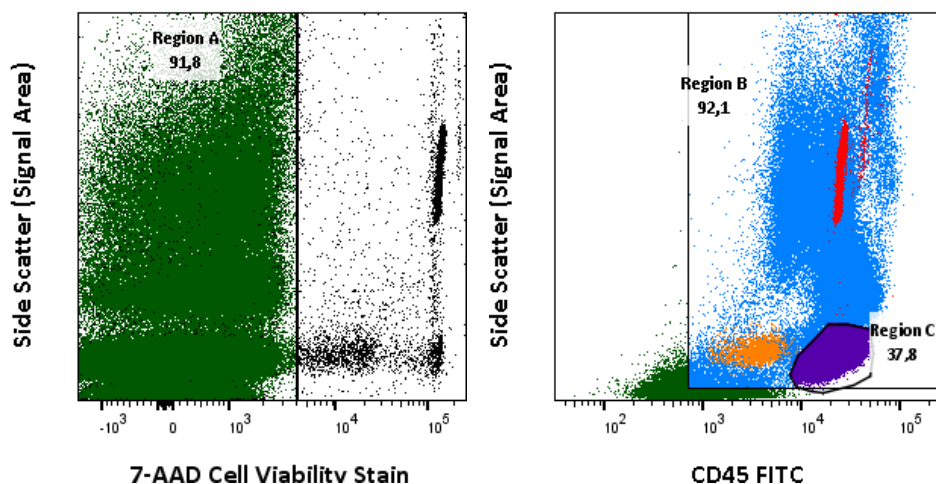
Prawdziwe komórki macierzyste CD34+ dostarczają również sygnał rozproszenia światła pod kątem do przodu, podobnie jak komórki blastyczne lub limfocyty, i wykazują niskie właściwości rozpraszania światła prostopadłego (rozpraszanie boczne).

Rysunki 1–5 przedstawiają sekwencję bramkowania logicznego zapewniającą dokładną identyfikację żywych komórek macierzystych CD34⁺ na potrzeby dokładnego zliczenia procentowego.

Najpierw wszystkie zdarzenia przedstaw wizualnie na wykresie punktowym jako zależność **rozproszenia bocznego SSC-A i barwnika żywotności 7-AAD** oraz umieść bramkę wokół żywych komórek (7-AAD-ujemnych), jak pokazuje region A na ilustracji po lewej.

UWAGA: W przypadku stosowania stabilizowanego testu krwi, np. Streck CD-Chex CD34®, zdecydowanie zaleca się sprawdzenie żywotności regionu A i w razie potrzeby zmianę jego położenia, ponieważ stabilizowana krew zawiera formaldehyd, który przenika błony komórkowe, powodując dodatni wynik barwienia barwnikiem żywotności 7-AAD.

Rysunek 1 Obraz po lewej stronie przedstawia selekcję populacji zdolnej do życia. Obraz po prawej stronie przedstawia wszystkie zdarzenia bramkowane z regionów A, B, C, G (pochodzące z regionu F) i I.

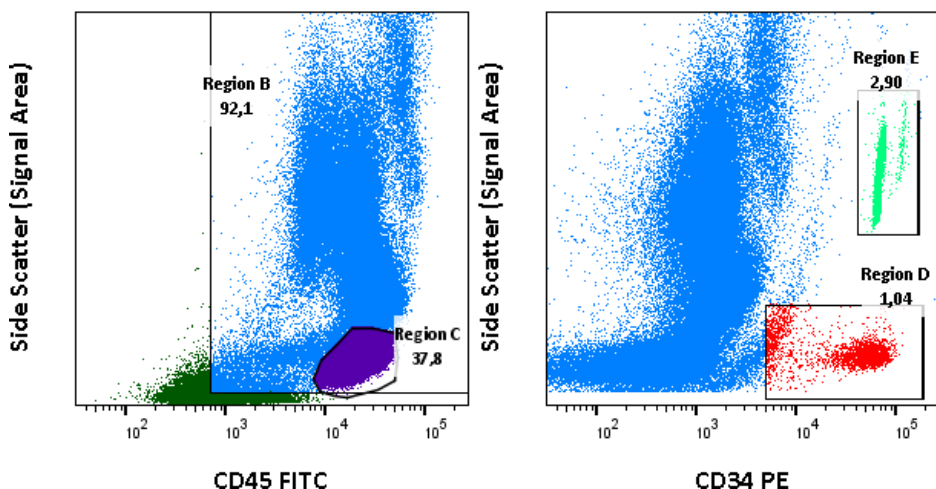


Zwizualizuj komórki z regionu A na wykresie punktowym przedstawiającym zależność SSC-A i CD45 FITC i umieść bramkę wokół **leukocytów (region B)** oraz wokół **limfocytów** reprezentowanych przez region C.

Przenieś komórki z regionu B na wykres punktowy przedstawiający zależność SSC-A i CD34 PE i umieść bramkę wokół **zdarzeń CD34-dodatnich (region D)**.

Obraz po prawej stronie przedstawia **wszystkie zdarzenia**, w tym fluorescencyjne mikrocząstki z regionu I przedstawione w **regionie E**. **Region E** wskazuje właściwości optyczne i fluorescencyjne standardu zliczania mikrocząstek fluorescencyjnych obecnego w próbce BD TruCount™ (tylko w przypadku metody jednoplatformowej).

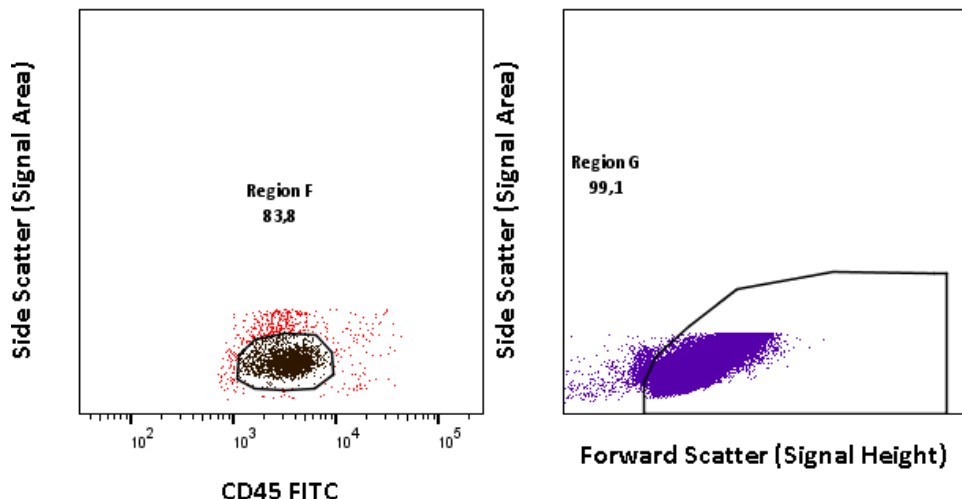
Rysunek 2 Obraz po lewej stronie przedstawia selekcję populacji żywych leukocytów (region B) i limfocytów (region C). Obraz po prawej stronie przedstawia żywe zdarzenia CD34-dodatnie (region D) wyselekcjonowane z leukocytów (region B). W przypadku metody pojedynczej platformy bramkę (region E) można umieścić wokół koralików fluorescencyjnych.



Wyczyść zdarzenia CD34-dodatnie z regionu D, umieszczając **region F** wokół klastra komórek CD45 dim-dodatnich na wykresie punktowym przedstawiającym zależność rozproszenia SSC-A od CD45 FITC ze zdarzeniami z regionu D, jak pokazano na rysunku 3 po lewej stronie.

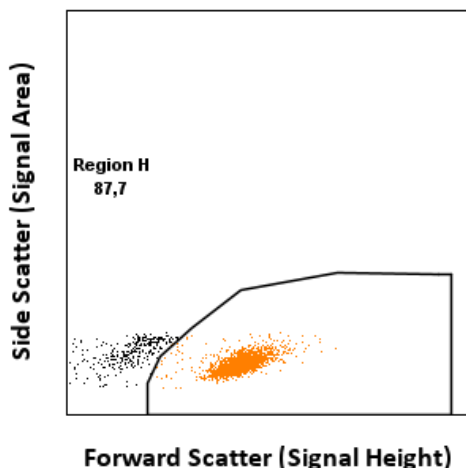
Wyświetl limfocyty CD45⁺ (region C) na wykresie punktowym przedstawiającym zależność obszaru sygnału SSC-A od wysokości sygnału rozproszenia do przodu FSC-H. Umieść nową bramkę oddzielającą limfocyty CD45⁺ od mniejszych zdarzeń i zanieczyszczeń (**region G**), jak pokazano na rysunku 3 po prawej stronie.

Rysunek 3 Obraz po lewej stronie przedstawia usuwanie niespecyficznych przypadków barwienia CD34, tj. płytek krwi lub agregatów. Region F został użyty do określenia specyficznie barwionych komórek CD34⁺ CD45^{dim}SSC^{low}. Obraz po prawej stronie przedstawia odgraniczenie limfocytów CD45⁺ (region G) od regionu C.



Skopiuj bramkę **regionu G** odgraniczającą limfocyty z **rys. 3** (prawy obraz) i wklej ją do wykresu punktowego przedstawiającego zależność sygnału SSC-A od FSC-H zawierającego zdarzenia z **regionu F** oraz utwórz **region H**, w celu odróżnienia klastra komórek macierzystych CD34⁺ od mniejszych zdarzeń i zanieczyszczeń. Komórki z regionu F (rysunek 3) znajdujące się wewnątrz bramki **regionu H** reprezentują prawdziwe komórki macierzyste CD34⁺.

Rysunek 4 Na zdjęciu przedstawiono selekcję prawdziwych komórek macierzystych CD34⁺ (region H).



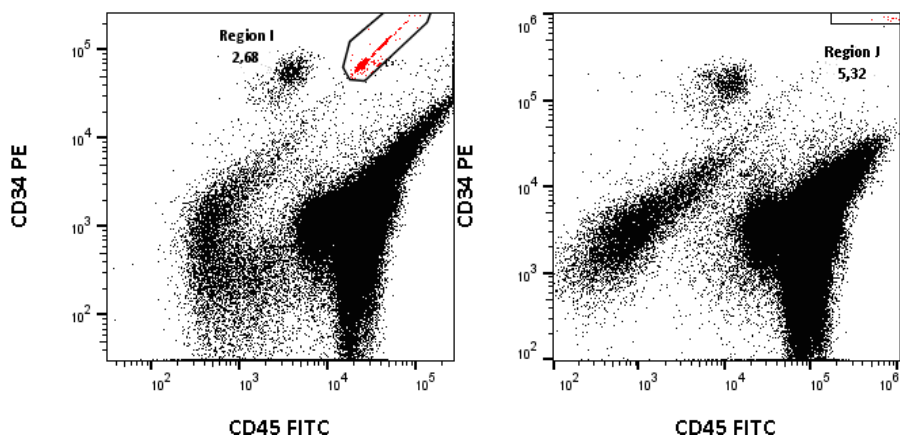
Tylko dla metody pojedynczej platformy:

Aby mieć pewność, że umieszczona zostanie właściwa bramka dla koralików fluorescencyjnych (region E), należy uwidocznić bramki sterujące (regiony I, J, K na rysunkach 5 i 6).

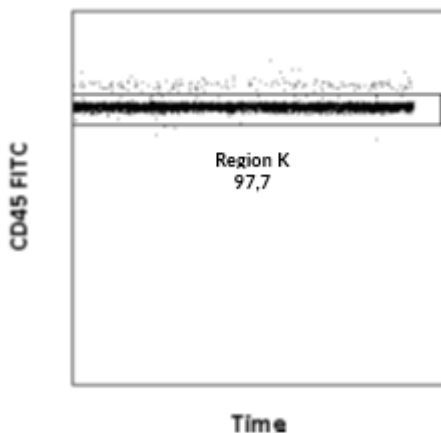
Zwizualizuj **wszystkie zdarzenia** na wykresie przedstawiającym zależność CD34 PE od CD45 FITC i umieść obszary wokół fluorescencyjnego wzorca liczenia mikrocząstek, oddzielając mikrocząstki z BD TruCount™ (**region I**) lub mikrocząstki z Flow-Count™ firmy Beckman Coulter (**region J**).

UWAGA: Rozmiar kulek i właściwości fluorescencyjne mogą się różnić w zależności od producenta.

Rysunek 5 Obraz po lewej stronie przedstawia rozmiar i właściwości fluorescencyjne koralików BD TruCount™ Tube (region I). Obraz po prawej stronie przedstawia rozmiar i właściwości fluorescencyjne kulek BC Flow-Count™ Fluorospheres (region J).



Rysunek 6 Obraz przedstawia wszystkie pojedyncze koraliki zliczane w czasie (region K).



UWAGA: Wszelkie niejednorodności w regionie K (zaburzenia w akwizycji, spadek fluorescencji) powinny zostać wzięte pod uwagę do zbadania. Niejednorodna akwizycja zdarzeń lub akwizycja, która nie jest prostopadła do osi CD45 FITC wskazuje na problemy z przepływem cieczy w cytometrze przepływowym.

Obliczanie i interpretacja wyników analiz – metoda Single Platform (pojedynczej platformy)

Użyj poniższych równań do obliczenia procentowej i bezwzględnej liczby żywych komórek macierzystych CD34⁺ ze wszystkich żywych leukocytów.

Zliczenie bezwzględnej liczby *żywych komórek macierzystych CD34⁺ na 1 μl materiału krwi*:

$$CD34^+ Abs = \frac{Region\ H}{Region\ E} \times \frac{P}{V} \times DF$$

Zliczenie liczby bezwzględnej żywych leukocytów w 1 μl materiału krwi:

$$WBC\ Abs = \frac{Region\ B}{Region\ E} \times \frac{P}{V} \times DF$$

Zliczenie procentowe żywych komórek macierzystych CD34⁺ ze wszystkich żywych leukocytów:

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

CD34⁺ Abs bezwzględna liczba żywych komórek macierzystych CD34⁺ na 1 μl materiału krwi

WBC Abs bezwzględna liczba żywych leukocytów na 1 μl materiału krwi

% CD34⁺ procent żywych komórek macierzystych CD34⁺ ze wszystkich żywych leukocytów

Region B liczba zdarzeń w Regionie B (leukocyty)

Region H prawdziwe komórki macierzyste CD34⁺

Region E liczba zdarzeń w Regionie E (mikrocząsteczki)

P liczba mikrocząstek na test (obecna w próbówce) wskazana przez producenta mikrocząstek

V objętość próbki– 100 μl

DF współczynnik rozcieńczenia (rozcieńczenie próbki przed barwieniem);
DF = 2 oznacza, że 1 część materiału krwi (100 μl) została rozcieńczona 1 częścią PBS zawierającego 0,5% BSA (100 μl)

Obliczanie i interpretacja wyników analiz – metoda Dual Platform

Użyj analizatora hematologicznego, aby określić liczbę leukocytów na μl próbki. Patrz instrukcje producenta analizatora hematologicznego.

Użyj poniższych równań do obliczenia procentowej i bezwzględnej liczby żywych komórek macierzystych CD34⁺ ze wszystkich żywych leukocytów.

Zliczenie bezwzględnej liczby żywych komórek macierzystych CD34⁺ na 1 µl materiału krwi:

$$CD34^{+} Abs = \frac{Region\ H}{Region\ B} \times WBC\ Abs \times DF$$

Zliczenie procentowe żywych komórek macierzystych CD34⁺ ze wszystkich żywych leukocytów:

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

<i>CD34⁺ Abs</i>	bezwzględna liczba żywych komórek macierzystych CD34 ⁺ na 1 µl materiału krwi
<i>WBC Abs</i>	liczba bezwzględna żywych leukocytów na 1 µl materiału krwi określona za pomocą analizatora hematologicznego
<i>% CD34⁺ leukocytów</i>	procent żywych komórek macierzystych CD34 ⁺ ze wszystkich żywych leukocytów
<i>Region B</i>	liczba zdarzeń w Regionie B (leukocyty)
<i>Region H</i>	liczba prawdziwych komórek macierzystych CD34 ⁺
<i>DF</i>	współczynnik rozcieńczenia (rozcieńczenie próbki przed barwieniem); DF = 2 oznacza, że 1 część materiału krwi (100 µl) została rozcieńczona 1 częścią PBS zawierającego 0,5% BSA (100 µl)

11. Wydajność analityczna

Specyficzność

Przeciwciało MEM-28 rozpoznaje wszystkie izoformy leukocytów ludzkiego CD45 (receptor białkowej fosfatazy tyrozynowej typu C). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztaty HLDA (warsztaty HLDA III ⁽¹⁹⁾).

Przeciwciało 4H11[APG] rozpoznaje epitop klasy III ludzkiego antygenu CD34 (Mucosialin). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztaty HLDA (warsztaty HLDA VI ⁽²⁰⁾).

Dokładność

Dokładność metody określono jako porównanie urządzenia CD34 QuantiFlowEx Kit z dobrze udokumentowaną metodą dwuplatformową akredytowanego laboratorium klinicznego (koktajl jednobarwnych sprzężonych przeciwciał różnych producentów połączony z roztworem lizującym na bazie chlorku amonu) poprzez równoległe barwienie 75 próbek krwi lub tkanek analizowanych zarówno cytometrem przepływowym BD FACSCanto™ II, jak i cytometrem przepływowym Beckman Coulter Navios (tabele 4, 5, 6). Parametry analizy regresji liniowej podano w tabelach 4–6.

Tabela 4 Analiza regresji liniowej dla komórek macierzystych CD34+ we krwi obwodowej (porównanie urządzenia CD34 QuantiFlowEx Kit z akredytowaną metodą kliniczną stosowaną w laboratorium) analizowanych za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II lub cytometru przepływowego Beckman Coulter Navios.

Porównanie ED7080 z akredytowaną metodą						
Krew obwodowa						
Populacja docelowa	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwyt	r ²	Zakres
CD34 ⁺ CD45dim	%	30	0,9743	-0,0005	0,9967	0,02 - 2,22
	komórek/μl	30	0,9757	-0,4106	0,9947	0,24 - 468

Tabela 5 Analiza regresji liniowej dla komórek macierzystych CD34+ w produktach leukaferazy (porównanie urządzenia CD34 QuantiFlowEx Kit z akredytowaną metodą kliniczną stosowaną w laboratorium) analizowanych za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II lub cytometru przepływowego Beckman Coulter Navios.

Porównanie ED7080 z akredytowaną metodą						
Produkty leukaferazy (PBSC)						
Populacja docelowa	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwyt	r ²	Zakres
CD34 ⁺ CD45dim	%	25	0,9999	-0,0061	0,9925	0,81 - 10,56
	komórek/μl	25	0,9844	45,762	0,9918	1392 - 17497

Tabela 6 Analiza regresji liniowej dla komórek macierzystych CD34+ w szpiku kostnym (porównanie urządzenia CD34 QuantiFlowEx Kit z akredytowaną metodą kliniczną stosowaną w laboratorium) analizowanych za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II lub cytometru przepływowego Beckman Coulter Navios.

Porównanie ED7080 z akredytowaną metodą						
Szpik kostny						
Populacja docelowa	Jednostka	n	Nachylenie	Przechwyt	r ²	Zakres
CD34 ⁺ CD45dim	%	20	0,9385	0,0467	0,9954	0,24 - 3,14
	komórek/μl	20	1,028	-4,1351	0,9991	47 - 1708

Liniowość

Liniowość metody została zweryfikowana na pochodnych krwi „Buffy Coat” zdrowych dawców, do których dodano 11 kolejnych (seryjnych; 2-krotnych) rozcieńczeń komórek CD34+ (KG-1) w ciągu 1 dnia przez 1 operatora, analizowanych za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II. Regresję liniową zastosowano do oceny wartości oczekiwanej w stosunku do średniej wartości odzyskiwanej przy każdym rozcieńczeniu. Zakres liniowości podano w

tabeli 7.

Tabela 7 Liniowość urządzenia na BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Populacja docelowa	Jednostka	Nachylenie	Przechwyt	r ²	Zakres
CD34 ⁺ CD45dim	komórek/ μ l	1,0648	4,4804	1,0000	3,64 – 2862

Powtarzalność

Powtarzalność testu mierzono na dziesięciu próbkach krwi w heksaplikacjach. Próbkę analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSLytic™ i cytometru przepływowego Sysmex XF-1600™. Współczynniki zmienności (CV) przedstawiono w poniższych tabelach (tabela 8 i 9).

Tabela 8 Powtarzalność urządzenia na BD FACSLytic™

BD FACSLytic™					
Populacja docelowa	Jednostka	N	Oceniony zakres wartości	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0035	7,2
	komórek/ μ l	10	8-20	1,0	7,2

Tabela 9 Powtarzalność urządzenia na Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™					
Populacja docelowa	Jednostka	N	Oceniony zakres wartości	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0047	9,4
	komórek/ μ l	10	7-20	1,2	9,4

Powtarzalność

Powtarzalność testu mierzono na stabilizowanej próbce krwi (CD- Chex CD34, poziom 3) w tych samych warunkach przez 15 dni. Próbkę analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSLytic™ i cytometru przepływowego Sysmex XF-1600™. Współczynniki zmienności (CV) podano w poniższych tabelach (tabela 10 i 11).

Tabela 10 Powtarzalność urządzenia na BD FACSLyric™

Powtarzalność – BD FACSLyric™						
Typ próbki	Oczekiwany zakres (%)	Oczekiwana wartość średnia (%)	Uzyskana wartość średnia (%)	SD	CV (%)	Zakres mierzonych wartości
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 – 1,95	1,65	1,67	0,06	3,6	1,46-1,70

Tabela 11 Powtarzalność urządzenia na Sysmex XF-1600™

Powtarzalność – Sysmex XF-1600™						
Typ próbki	Oczekiwany zakres (%)	Oczekiwana wartość średnia (%)	Uzyskana wartość średnia (%)	SD	CV (%)	Zakres mierzonych wartości
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 – 1,95	1,65	1,54	0,04	2,8	1,48-1,62

UWAGA: Do analizy metodą cytometrii przepływowej wykorzystano następujące cytometry przepływowe wraz z wersją oprogramowania:

BD FACSCanto™ II BD FACSDiva Software – wersja 8.0.2

BD FCSLyric™ BD FACSSuite Software – wersja 1.5

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

Navios EX Navios Ex Software v2.0

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

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

Do oceny zmierzonych danych wykorzystano platformę analityczną:

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

12. Wydajność kliniczna

Dane kliniczne zebrano w ośrodku klinicznym. Skuteczność kliniczną urządzenia ED7080 określono poprzez porównanie CD34 QuantiFlowEx Kit z metodą stosowaną w akredytowanym laboratorium klinicznym. Przebadano 75 próbek, w tym krew obwodową, produkty leukaferezy i próbki szpiku kostnego. Różnica między metodami wyniosła mniej niż 10% w 67 z 75 oznaczeń, co oznacza, że wyniki uzyskane obiema metodami były w dużej mierze takie same. Względne różnice pomiędzy metodami wahały się od -13% do +11%. Dane te następnie

porównano, stosując analizę regresji liniowej oraz ocenę Blanda-Altmana dotyczącą zgodności metod (względna różnica w liczbie), która wykazała bardzo dobrą zgodność metod. Średnia wartość względnych różnic w liczbie próbek pomiędzy dwiema metodami wynosi 1% a błąd standardowy wyniósł 6%. Wytyczne dotyczące oznaczania komórek macierzystych CD34+ sugerują porównywanie wyników z maksymalną dopuszczalną względną różnicą między duplikatami dochodzącą do 10% ⁽²¹⁾. Zgodnie z tymi zaleceniami metody te dostarczają danych, które można traktować jako równe.

13. Oczekiwane wartości

Urządzenie jest przeznaczone do wykrywania i zliczania wszystkich żywotnych hematopoetycznych komórek macierzystych i samo nie pozwala na ustalenie rozpoznania, w którym zakresie można ustalić wartości prawidłowe.

Dla trzech typów próbek zakresy wartości uzyskane z badań klinicznych przedstawiono w Rozdziale 11 (Wydajność analityczna), część Dokładność.

14. Ograniczenia

Urządzenie nie jest przeznaczone do identyfikacji i zliczania mezenchymalnych, nerwowych, nabłonkowych i skórnych komórek macierzystych.

Próbkę z bardzo dużą liczbą białych krwinek należy rozcieńczyć przed barwieniem w PBS, aby uzyskać liczbę leukocytów mniejszą niż 20×10^3 komórek/ μl ⁽²²⁾.

15. Bibliografia

- 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, <https://doi.org/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) Lecoeur 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. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/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. *Oncolmmunology*. 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. doi: 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. Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania

Podsumowanie bezpieczeństwa i działania będzie dostępne w bazie danych Eudamed pod adresem <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Do tego czasu podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania jest dostępne na żądanie.

17. Używanie znaków towarowych stron trzecich

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, Trucount™, FlowJo™ są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company, Sysmex XF-1600™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Sysmex Corporation, CD-Chex CD34® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Streck, Fluorosfery Navios™, Flow-Count™ są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Beckman Coulter.

18. Historia zmian

Wersja 5, ED7080_IFU_v5

Nowy układ IFU zgodny z wymogami IVDR (UE) 2017/746. Dodanie numeru identyfikacyjnego jednostki notyfikowanej. Dodano nowy rozdział nr 16. 16. Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania. Zmodyfikowano tekst strategii bramkowania, wprowadzono zalecenia dotyczące bramkowania na jednej platformie. Wyjaśnienie pojęcia współczynnika rozcieńczenia. Zmiany w rozdziałach 11, 12, 14 i 15 (dodanie danych analitycznych i klinicznych).

19. Producent

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Republika Czeska

Informacje kontaktowe

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

20. Upoważnieni przedstawiciele

N/A

UWAGA: Każdy poważny incydent, który miał miejsce w związku z urządzeniem, należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi lokalnemu.