EXCELLYSE I
100 мл | Кат.Ном. **ED7065**

IVD CE

Инструкция по эксплуатации:
Версия ED7065_IFU_v7_EN
Дата издания: 20-01-2023

Символы

IVD	Медицинское устройство для диагностики in vitro		Беречь от солнечного света
CE	Маркировка соответствия CE		Хранить в сухом месте Беречь от дождя
	Производитель	CONTENTS	Содержание
UDI	Уникальный идентификатор устройства	UKCA	Знак UKCA
	Ознакомьтесь с инструкцией по использованию		
REF	Номер по каталогу		
LOT	Код партии		
	Использовать до		
	Температура хранения		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Назначение

EXCELLYSE I представляет собой лизирующий раствор, предназначенный для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов после окрашивания периферической цельной крови человека антителами, конъюгированными с флуорохромом, перед анализом проточной цитометрии.

Что обнаруживается и/или измеряется

Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

Функция устройства

Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор, предназначенный для диагностических процедур in vitro, связанных с анализом проточной цитометрии.

Контекст физиологического или патологического состояния

Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

Тип анализа

Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

Тип требуемого образца

Образец периферической цельной крови человека с антикоагулянтами.

Тестируемая популяция

Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

2. Предполагаемый пользователь

Устройство предназначено только для профессионального лабораторного использования. Не для тестирования у пациента или самотестирования.

Требования к квалификации

Предполагаемый пользователь должен обладать новейшими знаниями в области анализа клеток человека методом проточной цитометрии, стандартными лабораторными методами, включая навыки пипетирования, безопасного и надлежащего обращения с образцами, полученными из человеческого тела. Предполагаемый пользователь должен соответствовать стандарту EN ISO 15189 или другим национальным стандартам, где это применимо.

3. Принцип тестирования

Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор, вызывающий гипотонический лизис эритроцитов при сохранении лейкоцитов для анализа методом проточной цитометрии.

4. Реагент(ы) в комплекте

Содержимое

Устройство EXCELLYSE I рассчитано на лизирование 1000 проб крови и поставляется со следующими реагентами: 1 флакон (100 мл), содержащий готовый к использованию раствор.

5. Материалы (не входят в комплект)

Пробироки с круглым дном диаметром 12x75 мм

Деионизированная вода (х.ч.)

Фосфатный буферный раствор (1X PBS), pH 7,4 (0,2 г/л KH_2PO_4, 1,42 г/л $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 8,0 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl)

Соответствующие первичные/вторичные антитела, меченные флуоресцентными красителями

6. Необходимое оборудование

Автоматическая пипетка с одноразовыми наконечниками (50–100 мкл) для дозирования образцов и реагентов.

Дозатор жидкости или пипетка с одноразовыми наконечниками (1,0–3,0 мл) для дозирования деионизированной воды.

Вихревой смеситель

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Центрифуга
Проточный цитометр

7. Хранение и обращение.

Хранить при температуре 2–25 °C.
Избегайте длительного воздействия света.
Не замораживать.
См. раздел 10 «Процедура (приготовление реагентов)» для получения информации о стабильности при использовании и сроке хранения после первого открытия, а также об условиях хранения и стабильности рабочих растворов (если применимо).

8. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования

Классификация опасностей СГС

ВНИМАНИЕ: EXCELLYSE I (ED7065) содержит формальдегид (номер CAS 50-00-0) и метанол (номер CAS 67-56-1) в концентрациях, классифицируемых как опасные.

Эмблема	Меры предосторожности
	Опасность
Н-фразы	H302 Вредно при проглатывании. H315 Вызывает раздражение кожи. H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию. H319 Вызывает серьезное раздражение глаз. H335 Может вызывать раздражение дыхательных путей. H341 Предположительно вызывает генетические дефекты H350 Может вызывать рак
Р-фразы	P201 Перед использованием получите специальные инструкции. P264 После работы тщательно вымыть руки и открытые части тела. P280 Носите защитные перчатки/защитную одежду/защиту глаз. P301+P312 ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: При плохом самочувствии обратитесь к врачу. P302+P352 ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды с мылом. P305+P351+P338 ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить полоскание P308+P313 ПРИ воздействии или обеспокоенности: обратитесь за медицинской помощью/советом. P333+P313 При появлении раздражения кожи или сыпи: обратиться за медицинской помощью. P362+P364 Снять загрязненную одежду и постирать ее перед повторным использованием.

Обратитесь к паспорту безопасности (SDS), доступному на странице продукта на сайте www.exbio.cz, для получения полной информации о рисках, связанных с химическими веществами и смесями, содержащимися в продукте, а также о том, как с ними следует обращаться и утилизировать.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Биологическая опасность
Биологические образцы человека, образцы крови и любые материалы, вступающие с ними в контакт, всегда считаются инфекционными материалами. Используйте средства индивидуальной защиты и обеспечения безопасности, чтобы избежать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. Соблюдайте все применимые законы, правила и процедуры по обращению и утилизации инфекционных материалов.
Свидетельства ухудшения
Обычно поставляемый реагент выглядит как прозрачная жидкость. Не используйте реагент, если вы заметили какие-либо изменения во внешнем виде, например, помутнение или признаки выпадения осадка.
Ограничение использования
Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке продукта.

9. Образец
Используйте венозную периферическую кровь, собранную в сосуд для образцов, классифицированный как медицинское устройство, с антикоагулянтом ЭДТА или гепарином.

10. Процедура
Приготовление предоставленного реагента(ов)
Перед использованием доведите реагент до комнатной температуры. После первого вскрытия реагент сохраняет свои эксплуатационные характеристики до истечения срока годности при хранении в заявленных условиях в оригинальной первичной упаковке.
Подготовка необходимых, но не предоставляемых материалов
Перед использованием доведите деионизированную воду и 1X PBS до комнатной температуры.
Контроль качества
Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор.
Протокол лизирования/лизирования без промывки
1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Следуйте инструкциям производителя антител по окрашиванию цельной крови.
3. Добавьте 100 мкл лизирующего раствора на 50 мкл цельной крови. Перемешайте содержимое пробирки вихревой мешалкой.
4. Инкубируйте 2–5 минут при комнатной температуре.
5. Добавьте в пробирку 1 мл деионизированной воды, хорошо перемешайте и инкубируйте около 5–10 минут, пока размытый раствор образца крови не станет прозрачным.
6. Немедленно проанализируйте обработанный образец с помощью проточного цитометра. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, храните его при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 24 часов.
Протокол лизиса/промывки
1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Следуйте инструкциям производителя антител по окрашиванию цельной крови.
3. Добавьте 100 мкл лизирующего раствора на 50 мкл цельной крови. Перемешайте содержимое пробирки вихревой мешалкой.
4. Инкубируйте 2–5 минут при комнатной температуре.
5. Добавьте в пробирку 3 мл деионизированной воды, хорошо перемешайте и инкубируйте около 5–10 минут, пока размытый раствор образца крови не станет прозрачным.
6. Центрифугируйте пробирку в течение 5 минут при 300 g.
7. Декантируйте надосадочную жидкость и ресуспендируйте осадок в 0,2–0,5 мл 1X PBS.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Немедленно проанализируйте обработанный образец с помощью проточного цитометра. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, храните его при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 24 часов.

Анализ проточной цитометрии

Проточный цитометр, выбранный для использования с устройством EXCELLYSE I, должен регулярно калиброваться с использованием флуоресцентных микрогранул для обеспечения стабильной чувствительности детекторов в соответствии с инструкциями производителя цитометра.

При неправильном обслуживании проточный цитометр может давать ложные результаты.

См. технические характеристики цитометров производителя лазеров и детекторов флуоресценции в соответствии с характеристиками возбуждения и излучения флуорохромов в разделе 6 «Необходимое оборудование».

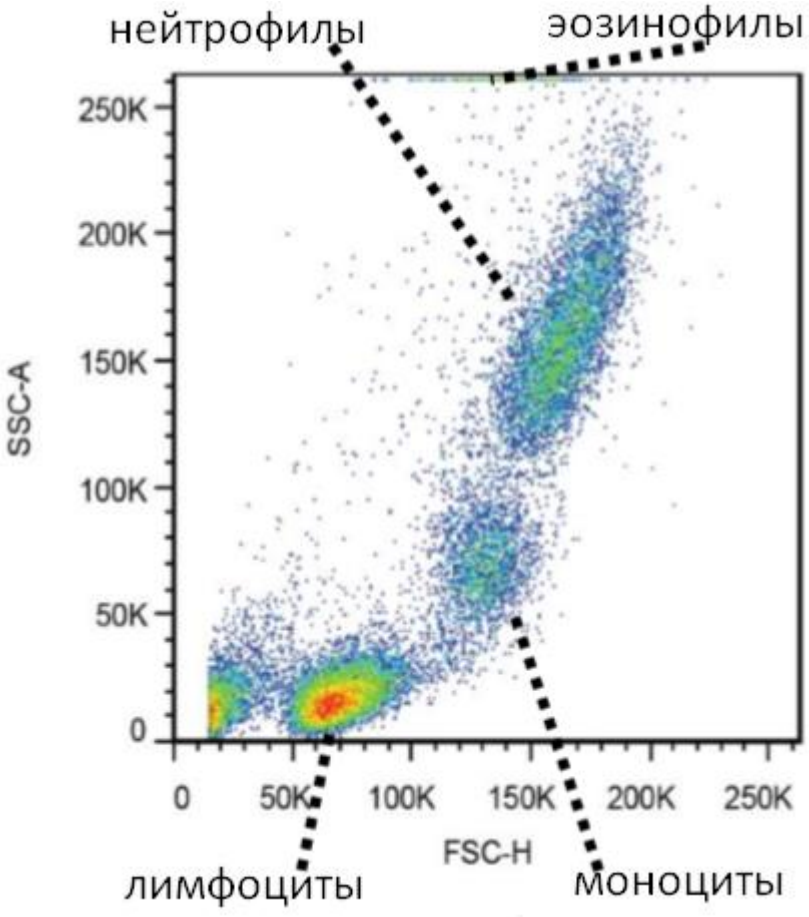
Установите напряжение на интересующих детекторах флуоресценции перед анализом окрашенных образцов. Напряжение на детекторе ФЭУ должно быть установлено достаточно высоким, чтобы минимум событий отрицательного окрашивания мешал 0-му каналу на оси флуоресценции. Также напряжение детектора ФЭУ не должно превышать значений, при которых положительные события смещаются к правой оси.

Компенсируйте сигналы флуоресценции между детекторами до или после сбора данных. Данные могут быть неправильно интерпретированы, если сигналы флуоресценции компенсируются неправильно или ворота расположены неточно.

Для анализа измеренных данных можно использовать программное обеспечение цитометра, разработанное производителем, или программное обеспечение, предназначенное для автономного анализа данных цитометрии (например, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Репрезентативные данные

Рисунок 1. Двумерная точечная диаграмма плотности, показывающая кластеры лейкоцитов периферической крови образца EXCELLYSE I, обработанного лизированием/без промывки, проанализированного на цитометре BD FACSCanto™ II.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 2. Профиль окрашивания цельной крови, окрашенной антителом, меченным анти-CD45 PerCP, обработанной по протоколу лизирования/без промывки и проанализированной на цитометре BD FACSCanto™ II.

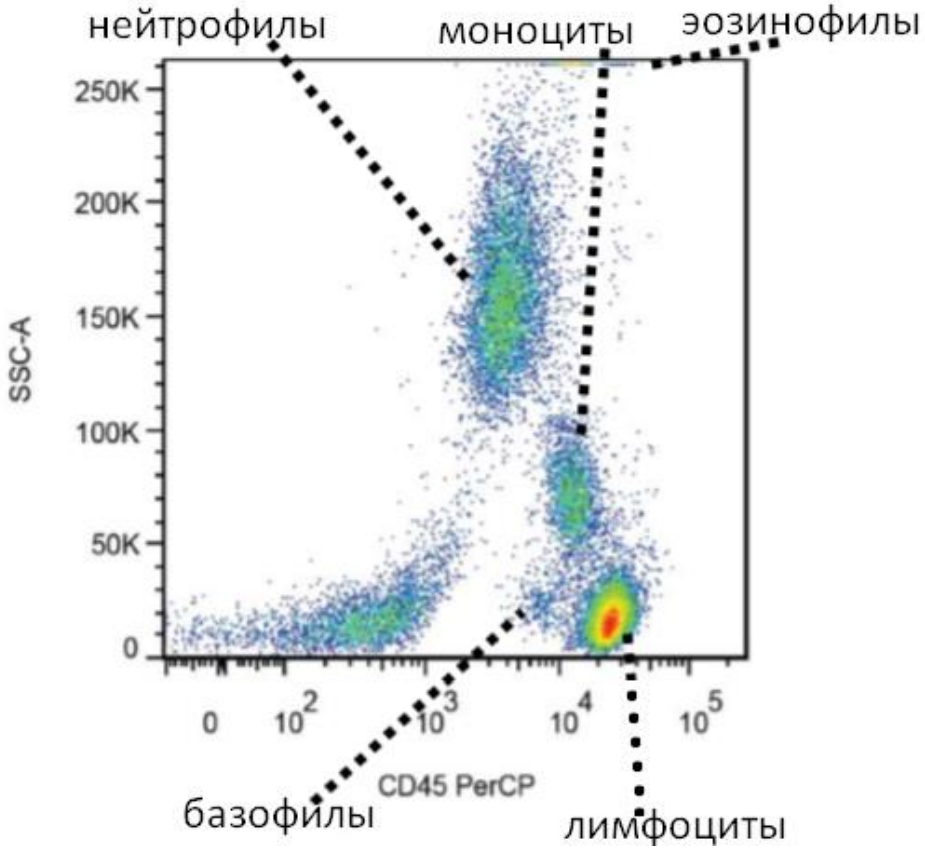
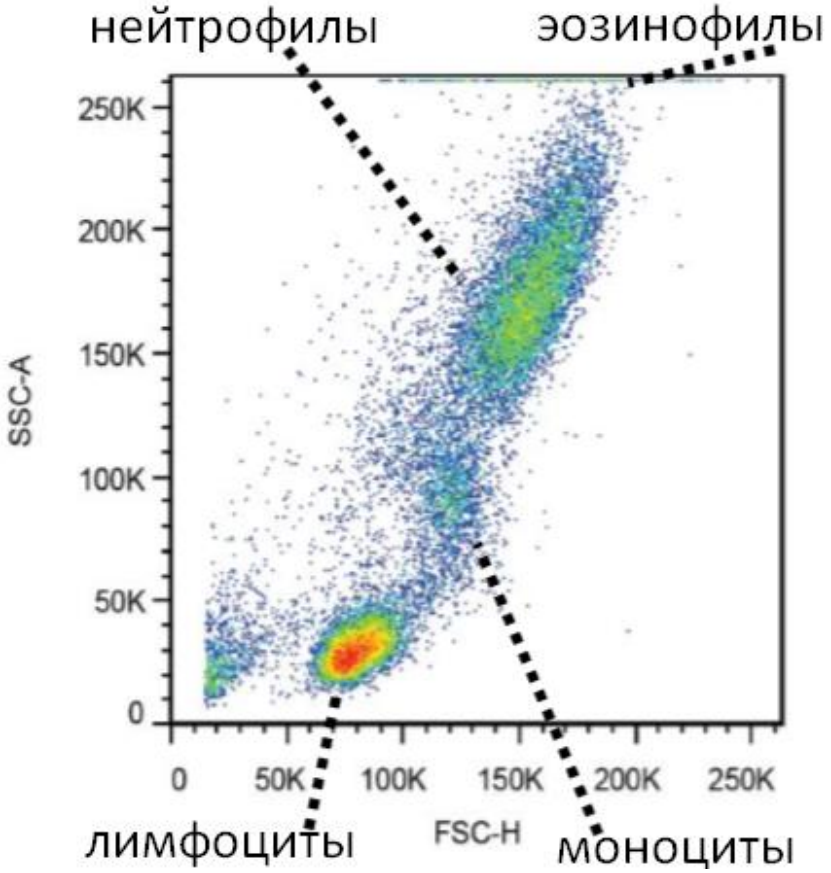
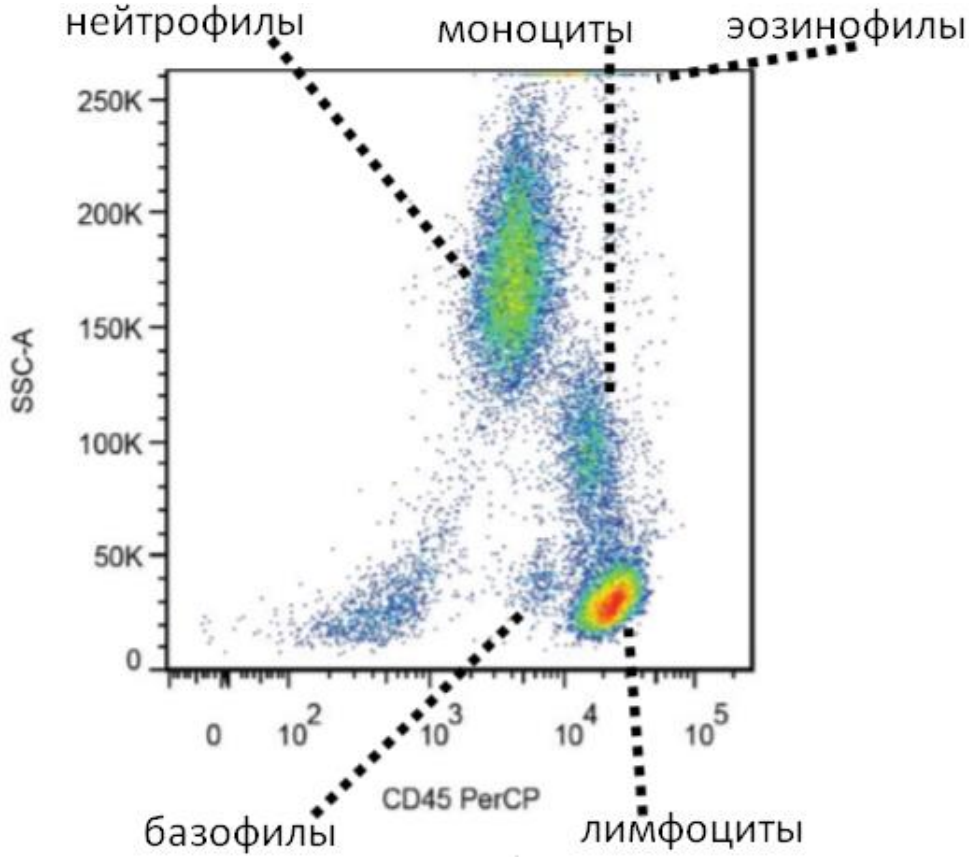


Рисунок 3. Двумерная точечная диаграмма плотности, показывающая кластеры лейкоцитов периферической крови образца, обработанного лизированием/промывкой EXCELLYSE I, проанализированного на цитометре BD FACSCanto™ II.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 4. Профиль окрашивания цельной крови, окрашенной антителом, меченным анти-CD45 PerCP, обработанной по протоколу лизирования/промывки и проанализированной на цитометре BD FACSCanto™ II.



Расчет и интерпретация аналитических результатов

Н/Д. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

11. Аналитическая деятельность

Работоспособность устройства характеризовалась восстановлением лейкоцитов, стабильностью образца во времени после его обработки, а также межпробирочной вариабельностью количества T-, B-, NK-лимфоцитов, выявленных и подсчитанных с помощью устройства CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell. 4-цветный.

Восстановление лейкоцитов

Образцы с антикоагулянтами ЭДТА (n=13) и гепарином (n=5) обрабатывали с помощью EXCELLYSE I и анализировали в режиме предварительного разведения на автоматическом гематологическом анализаторе SYSMEX XN1000. Восстановление определяли как отношение количества лейкоцитов в обработанном образце к количеству лейкоцитов в цельной крови перед лизисом. Псевдообработанные образцы (нелизированные, нецентрифугированные, разбавленные PBS) анализировались параллельно.

Таблица 1. Восстановление лейкоцитов в обработанных EXCELLYSE I образцах крови

	восстановление WBC	
	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
Без промывки		
ЭДТА	96	6
Гепарин	94	9
Псевдо-обработка	95	2
С промывкой		
ЭДТА	87	5
Гепарин	78	6
Псевдо-обработка	97	2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Стабильность количества лейкоцитов во времени после обработки пробы
Образцы с антикоагулянтами ЭДТА (n=9) и гепарином (n=5) обрабатывали EXCELLYSE I. Количество лейкоцитов анализировали сразу в режиме предварительного разведения автоматического гематологического анализатора SYSMEX XN1000 и снова после 24 часов хранения (в течение ночи) в холодильник. Изменение указывается в процентах (%) увеличения или уменьшения.

Таблица 2. Изменение количества лейкоцитов между обработанными EXCELLYSE I образцами, проанализированными сразу и после 24 часов хранения

	Относительное изменение количества WBC	
	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
Без промывки		
ЭДТА	-3	4
Гепарин	3	8
С промывкой		
ЭДТА	1	2
Гепарин	-1	3

Стабильность количества Т-, В-, NK-лимфоцитов во времени после обработки пробы
Образцы антикоагулянтов ЭДТА (n=1) и гепарина (n=1) окрашивали в гексапликатах с использованием устройства CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell 4-color и обрабатывали EXCELLYSE I. Анализы процентного содержания Т-, В- и NK-лимфоцитов методом проточной цитометрии анализировали сразу в проточном цитометре BD FACSCanto™ II и снова через 24 часа хранения (в течение ночи) в холодильнике. Для обоих измерений сообщаются значения количества и CV (%).

Таблица 3. Процентное содержание Т-, В-, NK-лимфоцитов в обработанных EXCELLYSE I образцах, анализируемых сразу и после 24 часов хранения.

	Встречаемость лимфоцитов (%)					
	CD3		CD16+56		CD19	
	Значение	CV(%)	Значение	CV(%)	Значение	CV(%)
Без промывки						
Немедленный анализ гепарина	75.1	0.3	13.5	1.4	8.3	1.5
Гепарин через 24 часа	76.4	0.4	12.9	1.4	8.5	1.5
Немедленный анализ ЭДТА	85.8	0.3	8.2	2.1	3.3	2.3
ЭДТА через 24 часа	86.3	0.6	8.1	3.7	3.3	3.9
С промывкой						
Немедленный анализ гепарина	77.1	0.3	13.6	1.3	8.4	1.8
Гепарин через 24 часа	78.0	1.2	13.3	4.2	8.1	5.5
Немедленный анализ ЭДТА	86.7	0.4	9.1	3.1	2.5	3.2
ЭДТА через 24 часа	87.7	0.3	8.3	2.5	2.5	5.7

Повторяемость (вариативность от пробирки к пробирке)
Повторяемость измеряли как вариабельность относительного количества Т-, В-, NK-лимфоцитов от пробирки к пробирке. Подсчет субпопуляций лимфоцитов определяли путем окрашивания цельной крови четырехцветным реагентом (CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell, 4 цвета). Гексапликаты образцов с антикоагулянтами ЭДТА (n=5) и гепарином (n=5) обрабатывали с использованием протоколов промывки EXCELLYSE I и без промывки и анализировали на цитометрах Beckmann Coulter DxFLEX и BD FACSCanto™ II.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4. Изменение количества Т-, В- и NK-лимфоцитов в разных пробирках в образцах, обработанных EXCELLYSE I и проанализированных на цитометре BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	Встречаемость лимфоцитов (%)					
	CD3		CD16+56		CD19	
	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)
Без промывки						
Гепарин	71-81	0.4	8-19	2.3	7-14	2.0
ЭДТА	59-75	0.7	11-29	2.0	4-19	2.3
С промывкой						
Гепарин	72-81	0.5	8-20	2.0	7-14	2.2
ЭДТА	60-77	0.6	9-29	2.3	4-19	3.1

Таблица 5. Изменение количества Т-, В-, NK-лимфоцитов в разных пробирках в образцах, обработанных EXCELLYSE I и проанализированных на цитометре Beckmann Coulter DxFLEX

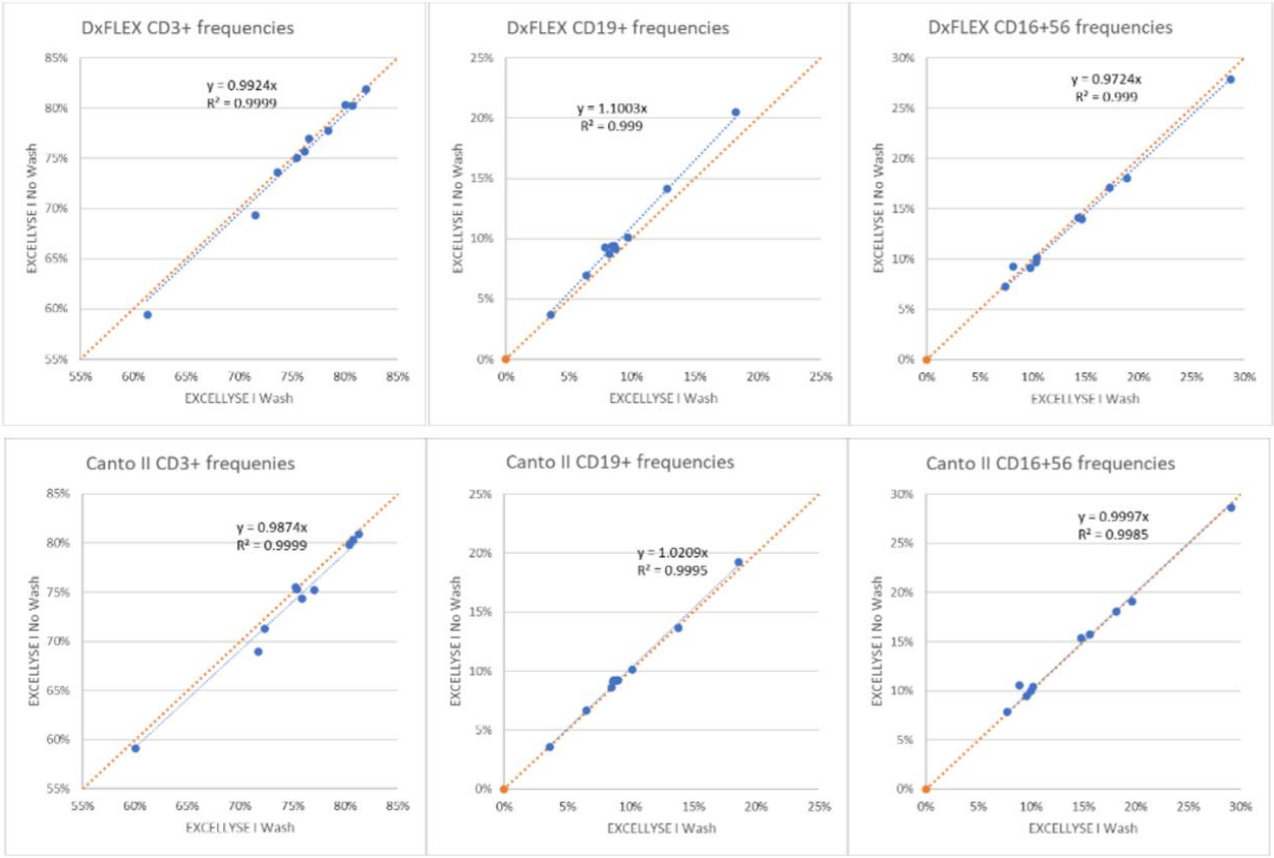
DxFLEX	Встречаемость лимфоцитов (%)					
	CD3		CD16+56		CD19	
	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)
Без промывки						
Гепарин	74-82	0.5	7-18	3.5	7-14	3.1
ЭДТА	59-78	0.6	9-28	2.1	4-21	3.6
С промывкой						
Гепарин	74-82	0.4	7-19	1.6	6-13	2.6
ЭДТА	61-78	0.6	8-29	2.1	4-18	2.2

Корреляция между отсутствием промывуи и протоколами промывки

Гексапликаты антикоагулянтов ЭДТА (n=5) и гепарина (n=5) окрашивали четырехцветным реагентом (CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell 4-цвет), обработанным с помощью промывки EXCELLYSE I и протоколов без промывки. Образцы немедленно анализировали на цитометрах Beckmann Coulter DxFLEX и BD FACSCanto™ II.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 5. Сравнение относительного количества Т-клеток, В-клеток и NK-клеток в образцах, обработанных с помощью промывки EXCELLYSE I, и без процедуры промывки. Образцы анализировали в цитометрах BD FACSCanto™ II (верхний ряд) и Beckmann Coulter DxFLEX (нижний ряд).



Воспроизводимость

N/A.

12. Клинические характеристики

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор. Он не дает результатов, которые можно соотнести с конкретным клиническим состоянием или физиологическим или патологическим процессом.

13. Ожидаемые значения

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

14. Мешающие вещества и ограничения

Протокол промывки показывает более низкое восстановление лейкоцитов из-за центрифугирования и декантации надосадочной жидкости. Использование вакуумной аспирации для удаления супернатанта может привести к непредсказуемой потере клеток и изменению показателей восстановления лейкоцитов.

15. Ссылки

N/A.

16. Товарные знаки

BD FACSCanto™ II и FlowJo™ — зарегистрированные торговые марки Becton, Dickinson and Company, Sysmex™ — зарегистрированная торговая марка Sysmex Corporation, VenturiOne® — зарегистрированная торговая марка Applied Cytometry, Infinicyt™ — зарегистрированная торговая марка Cytognos S.L..

17. История изменений

Версия 7, ED7065_IFU_v7

Изменен макет IFU, тексты адаптированы в соответствии с правилами IVD. Добавлена дополнительная информация о производительности устройства.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

18. Производитель

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

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

19. Уполномоченные представители

Ответственное лицо в Великобритании

Сисмекс ЮК Лтд.

Сисмекс Хаус
Гарамонд Драйв
Уимбуш
Милтон Кейнс
МК8 8ДФ
Великобритания
+44 (0)333 3203460
info@sysmex.co.uk

ВНИМАНИЕ: О любом серьезном происшествии, произошедшем с устройством, необходимо сообщать производителю и местному компетентному органу.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

BasoFlowEx Kit

Кат.ном. ED7043

1.Целевое назначение

Использование по назначению

Набор BasoFlowEx предназначен для исследования проточной цитометрии **IgE-опосредованных аллергических реакций** путем анализа экспозиции антигена CD63 на базофилах в гепаринизированной цельной крови человека при стимуляции аллергеном. Для стимуляции можно использовать имеющиеся в продаже аллергены.

Контекст физиологического или патологического состояния

Решающим моментом в диагностике аллергии является определение причинного аллергена. Достоверность обычно используемого метода кожного укола (SPT) невысока, и этот тест может способствовать развитию аллергического заболевания у пациента. Следовательно, рекомендуется проводить тесты in vitro, такие как определение специфического IgE в сыворотке (sIgE) или анализ маркеров активации базофилов. Хотя специфичность обнаружения sIgE достаточна для большинства аллергенов, его чувствительность обычно составляет около 75%. Более того, для пищевых и лекарственных аллергенов как чувствительность, так и специфичность обнаружения sIgE намного ниже. Напротив, тест активации базофилов (BAT) показывает очень высокую специфичность, а также высокую чувствительность, включая многие проблемные аллергены.

2. Принцип тестирования

Анализ BAT основан на стимуляции базофилов in vitro с использованием сенсибилизирующего аллергена и последующем проточном цитометрическом анализе экспозиции внешнего антигена CD63 на поверхности базофилов после дегрануляции. Если имеется достаточное количество аллерген-специфических молекул IgE, связанных с высокоаффинными рецепторами FcεRI на поверхности базофильных клеток, молекулы аллергена перекрестно связывают рецепторы, что приводит к полной активации базофила. Как следствие, цитоплазматические гранулы, содержащие трансмембранный белок CD63, сливаются с плазматической мембраной и высвобождают медиаторы воспаления. Следовательно, антиген CD63 выступает в качестве маркера активации (дегрануляции) базофилов. Обнаруженный антиген CD63 обнаруживается окрашиванием моноклональным антителом (клон MEM-259, помеченный FITC). Популяцию базофилов идентифицируют путем окрашивания с использованием моноклональных антител против CD203c (клон NP4D6, помеченный R-фикоэритрином (PE)). Образец положительного контроля стимулируют с использованием моноклонального антитела против молекулы IgE, которое имитирует процесс сшивания аллергеном молекул IgE на поверхности базофилов, и с использованием хемотаксического пептида N-формил-Met-Leu-Phe (fMLP), который активирует базофилы через рецептор fMLP (FPR1).

3. Реагенты

• ED7043-1 **Стимулирующий буфер** - 5 лиофилизирован-ных флаконов, 1 флакон предназначен для стимуляции 20 пробирок.

• ED7043-2 **Стимулирующий контроль** - 2 лиофилизиро-ванных флакона, 1 флакон предназначен для стимуляции 25 положительных контро-лей.

• ED7043-3 **Окрашивающий реагент** - 1 флакон, содер-жащий 2 мл смеси предвари-тельно смешанных антител: анти-CD63, меченные FITC + анти-CD203c, меченые PE.

• ED7043-4 **Лизирующий раствор** - 30 мл.

4. Необходимый материал (не входит в комплект)

Аллергены

Подходящие 5 мл пробирки для окрашивания крови (например, 12 × 75 мм)

Буфер PBS

Сверхчистая деминерализованная вода

5. Необходимое оборудование

Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками

Вихревой смеситель

Термостат для инкубации пробирок при 37 ° C

Центрифуга с ротором для пробирок

Проточный цитометр - возбуждение синим лазером на 488 нм, излучение света на 525 нм (FITC) и 575 нм (PE)

6. Хранение и обращение

Храните набор BasoFlowEx при температуре 2–8 ° C. Беречь от солнечного света. Срок годности указан на эти-кетках флакона и на коробке.

См. Раздел 9 «Процедура - подготовка реагентов» для получения информации о хранении восстановленных реагентов и их стабильности при использовании.

7. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования

• Предназначен для диагностики in vitro в лабораториях за пределами США и Канады.

• Этот комплект CE-IVD соответствует европейской директиве 98/79 / EC.

• Не используйте реагенты по истечении срока их годности.

• Избегайте загрязнения реагентов.

• Образцы крови считаются потенциально инфекционными, и с ними необходимо обращаться осторожно.

• Избегайте длительного воздействия света на окрашивающий реагент (ED7043-3).

• Лизирующий раствор (ED7043-4) содержит формальдегид и метанол.

H-фразы

H302 + H312 + H332: Вредно при проглатывании, контакте с кожей или при вдыхании.

H317: Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

H351: Предположительно вызывает рак.

P-фразы

P270: Не ешьте, не пейте и не курите при использовании этого продукта.

P280: Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица.

P301 + P312: ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: При плохом самочувствии обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу / терапевту.

P302 + P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом.

P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть, и это легко сделать. Продолжайте полоскание.

P501: Удалить содержимое / контейнер на уполномоченный объект для опасных отходов.

• См. Паспорт безопасности продукта для получения полной информации о потенциальных опасностях и о том, как безопасно работать с продуктом.

• Образец крови может содержать недостаточное количество базофилов.

• Базофилы в некоторых образцах крови не чувствительны к стимуляции.

• Надежность анализа зависит от качества аллергена.

• Проточный цитометр может дать ложные результаты, если устройство не выровнено и не обслуживается должным образом.

• Данные могут быть неправильно интерпретированы, если флуоресцентные сигналы были неправильно скомпенсированы или если ворота были установлены неточно.

• Окрашенные образцы следует анализировать в течение стандартизованного периода времени, но не позднее, чем через 2 часа после лизиса.

• Проточный цитометр следует регулярно калибровать с использованием флуоресцентных микрошариков, чтобы обеспечить стабильную чувствительность детекторов.

• Любое невыполнение процедуры анализа может привести к ложным результатам.

8. Образец

Для исследования используйте человеческую гепаринизированную цельную кровь.

Кровь необходимо собрать в пробирку с гепарином. Следуйте инструкциям производителя тюбика, чтобы обеспечить необходимый объем заполнения.

Антикоагулянты ЭДТА и цитрат отрицательно влияют на результаты анализа.

Образцы крови следует хранить при комнатной температуре.

Образцы крови необходимо обработать в течение 8 часов после сбора, если они хранятся при комнатной температуре.

Аэроаллергены (пыльца, клещи, пыль) могут загрязнять открытые пробирки в лаборатории и вызывать повышенное фоновое испарение.

9. Процедура

Подготовка реагентов

1. Восстановите лиофилизированный **стимулирующий буфер**, используя 2 мл деминерализованной воды. Неиспользованный объем буфера хранить при 2-8 ° C до **5 дней.**

В качестве альтернативы буфер можно разделить на аликвоты, один раз заморозить и хранить при темпера-туре ≤ -20 ° C для дальнейшего использования. Избегайте повторяющихся циклов замораживания / оттаивания.

2. Восстановите лиофилизированный **стимулирующий контроль**, используя 0,25 мл деминерализованной воды. Неиспользованный объем реагента хранить при температуре 2-8 ° C до 30 дней. В качестве альтернативы реагент можно разделить на аликвоты, один раз заморозить и хранить при температуре ≤ -20 ° C для дальнейшего использования. Избегайте повторяющихся циклов замораживания / оттаивания.

3. Остальные реагенты (**окрашивающий реагент, лизирующий раствор**) готовы к использованию.

Порядок проведения экспертизы

Для исследования одного образца крови подготовьте пробирки для **отрицательного контроля, положительного контроля и для образцов, которые будут стимулироваться разными аллергенами.** Для стимуляции можно использовать различные коммерчески доступные аллергены. Подготовьте образцы в соответствии со следующей процедурой.

1. Добавьте в тюбик:

• **аллерген-стимулированный образец** - 10 мкл аллергена,

• **образец отрицательного контроля** - ничего,

• **образец положительного контроля** - 10 мкл контроля стимуляции.

2. Добавьте 100 мкл буфера для стимуляции во все пробирки.

3. Добавьте 100 мкл гепаринизированной цельной крови во все пробирки и осторожно перемешайте.

4. Инкубируйте пробирки при 37 ° C в течение 15 минут на водяной бане или 25 минут в воздушном инкубаторе.

5. Добавьте 20 мкл окрашивающего реагента во все пробирки, аккуратно перемешайте на вортексе и инкубируйте в течение 20 минут при 2-8 ° C или на льду.

6. Добавьте 300 мкл лизирующего раствора во все пробирки, осторожно перемешайте на вортексе и инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре.

7. Добавьте 3-4 мл деминерализованной воды во все пробирки, осторожно перемешайте на вортексе и инкубируйте 5-10 минут при комнатной температуре до тех пор, пока эритроциты не лизируются.

8. Центрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 300x g.

9. Удалите супернатант и ресуспендируйте осадок в 0,20,4 мл буфера PBS.

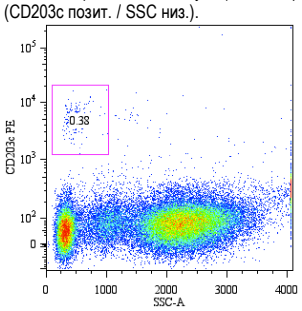
10. Проанализируйте образцы с помощью проточного цитометра в течение 2 часов после окрашивания.

Проточный цитометрический анализ

Анализируйте окрашенные образцы с помощью проточного цитометра. Чтобы проанализировать достаточное количество базофилов (> 200), соберите 50 000–100 000 событий на образец. Компенсируйте свои данные (каналы FITC и PE) до или после приобретения.

Визуализируйте скомпенсированные данные о боковом рассеянии (SSC) в зависимости от интенсивности флуоресценции в точечном графике канала PE (FL2). Установите границу для популяции базофилов (CD203c положительный, SSC низкий), как показано на рисунке 1. Граница должна быть установлена индивидуально для каждого образца.

Рис. 1 Определение популяции базофилов (CD203c позит. / SSC низ.).



Затем постройте закрытые базофилы в виде гистограммы, показанной на рисунках 2a, b, c, где ось X представляет интенсивность флуоресценции в канале FITC (FL1). Затем постройте закрытые базофилы в виде гистограммы, показанной на рисунках 2a, b, c, где ось X представляет интенсивность флуоресценции в канале FITC (FL1). Установите ворота для нестимулированных базофилов (CD63dim), используя образец отрицательного контроля.

Рис. 2a Гистограмма стимулированных аллергеном базофилов.

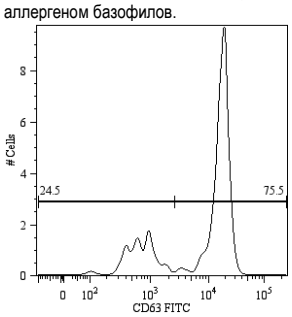


Рис. 2b Гистограмма базофилов отрицательного контроля.

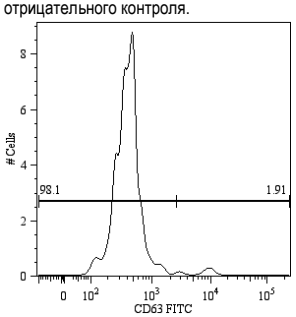
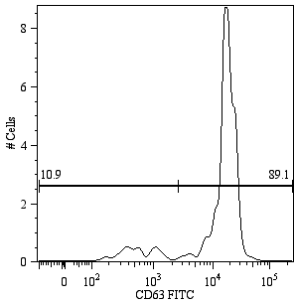


Рис. 2c Гистограмма базофилов положительного контроля.



Расчет и интерпретация аналитических результатов

Рассчитайте процент активированных базофилов ($CD63^{bright}$) в образцах, стимулированных аллергеном, и образцах положительного контроля.

Считается, что человек страдает аллергией на тестируемые аллергены, когда процент активированных базофилов превышает пороговое значение. Рекомендуемые пороговые значения для групп аллергенов следующие:

Ингаляционные и пищевые аллергены	≥15%
Яды перепончатокрылых	≥10%
Наркотики	≥5%

Если образец положительного контроля показывает активацию базофилов <20%,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

образцы, стимулированные аллергеном, не могут быть интерпретированы.

Точность (повторяемость и воспроизводимость)

Повторяемость и воспроизводимость анализа определяли по данным, измеренным пятью операторами с использованием шести сенсибилизирующих аллергенов в двух параллелях на одном образце крови в одних и тех же экспериментальных условиях. Используя дисперсионный анализ, были рассчитаны следующие параметры:

$CV^{повторяемость}$ = 2,4%
$CV^{воспроизводимость}$ = 3,4%

11. Клиническая воспроизводимость

Специфичность и чувствительность

Специфичность и чувствительность анализа определяли путем сравнения набора BasoFlowEx Kit с двумя конкурирующими тестами BAT, коммерчески доступными на рынке. Сравнение проводилось в рутинной клинической лаборатории по 100 тестам.

Параметр	BasoFlowEx vs. Comp. A	BasoFlow Ex vs. Comp. B	Comp. B vs. Comp. A
Чувствительность (%)	96.6	85.9	94.7
Специфичность (%)	82.9	79.3	69.2

Ожидаемые значения

Среднее количество активированных базофилов, измеренное в 20 образцах положительного контроля, приведено ниже. Теоретически количество активированных базофилов в образце, стимулированном аллергеном, может варьироваться в диапазоне 0–100%.

Параметр	Средний (%)	Стандартное отклонение	Коэф. Вариации (%)
Активированные базофилы	77.3	19.4	25.1

12. Ссылки

1. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Vallon C, Guerin JC (1998) Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. Inflamm Res. 47(10): 401-408
2. Sanz ML, Sánchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, Diéguez I, De Weck AL (2001) Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus and Lolium perenne. Clin. Exp. Allergy 31(7): 1007-1013
3. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Slodowy S, Merk HF, Sachs B (2003) CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollenassociated food allergy: sensitivity and specificity. Clin. Exp. Allergy 33(5): 607-614
4. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ (2004) In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? Clin. Exp. Allergy 34(3): 332339
5. Valent P, Hauswirth AW, Natter S, Sperr WR, Bühring HJ, Valenta R (2004) Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. Methods 32(3): 265-270

13. Производитель

EXBIO Praha, a.s.
Над Сафиноу II 341
252 50 Вестек
Чешская Республика
info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

14. Торговая марка

n/a

15. История правок

• Версия 1, ED7043_IFU_v1
первоначальный выпуск
• Версия 2, ED7043_IFU_v2
Изменение текста в разделе «Меры предосторожности»: текст «Предназначено только для профессионального использования» удален и заменен на «Предназначен для диагностического использования in vitro в лабораториях за пределами США и Канады». Этот комплект CE-IVD соответствует Европейской директиве о медицинских устройствах для диагностики in vitro 98/79/EC».
• Версия 3, ED7043_IFU_v3
Текст предупреждения был изменен с «Лизирующий раствор (ED7043-4) содержит < 5 % формальдегида» на «Лизирующий раствор (ED70434) содержит формальдегид и метанол». Фразы R и S, а также символ опасности были заменены фразами H и P и символами GHS в соответствии с Регламентом (ЕС) № 1272/2008.
• Версия 4, ED7043_IFU_v4
Текст «например. используется для прик-тестов» был удален из раздела «Предполагаемое использование». Текст «(например, для прик-тестов)» был удален из раздела «Необходимые материалы не предоставлены». Текст «например. Аллергены прик-тестов в подходящем разведении (1-10x)» был удален из раздела «Процедура анализа».
• Версия 5, ED7043_IFU_v5
Изменен логотип компании. Изменена компоновка IFU. В раздел «Хранение» добавлена фраза «беречь от солнечного света». В раздел «Образцы» был добавлен текст «Следуйте инструкциям производителя пробирки, чтобы обеспечить правильный объем наполнения». Текст «См. раздел 9 «Методика приготовления реагентов» для получения информации о хранении восстановленных реагентов и их стабильности при использовании». добавлен в раздел Хранение и обращение. Почтовый индекс производителя изменен с 25242 на 25250. Текст «Смотрите паспорт безопасности продукта для получения полной информации о потенциальных опасностях и о том, как безопасно работать с продуктом». добавлен в раздел «Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования».
• Версия 6, ED7043_IFU_v6
Текст ограничения использования продукта был уточнен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

exbio

BasoFlowEx Kit
100 tests | Cat.No. **ED7043**

IVD CE

Инструкция по эксплуатации

Версия ED7043_IFU_v6_EN
Date of Issue: 20-01-2020

EN

Символы

REF КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР
LOT НОМЕР ПАРТИИ
ИСПОЛЬЛЬЗОВАТЬ ДО
ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ПРЕДЕЛЫ ХРАНЕНИЯ
БЕРЕЧЬ ОТ СОЛНЕЧНОГО СВЕТА
IVD МЕДИЦИНСКОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO
CE МАРКИРОВКА CE СООТВЕТСТВИЯ
ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ
ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

Продукт предназначен для диагностики in vitro. Диагностическое или терапевтическое применение in vivo строго запрещено.
Продукция не может быть использована для перепродажи или передачи третьим лицам как самостоятельный продукт или как производственный компонент другого продукта без письменного согласия EXBIO Praha, a.s.
EXBIO Praha, a.s. не будет нести ответственность за нарушение патентных прав или любые другие нарушения прав интеллектуальной собственности, которые могут произойти при использовании продуктов. Заказы на все продукты принимаются в соответствии с Условиями, доступными на сайте www.exbio.cz. EXBIO, логотип EXBIO и все другие товарные знаки являются собственностью EXBIO Praha, a.s..

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

KOMBITEST B/NK Cell 4-color
50 тестов | Кат.Ном. **ED7735**

IVD CE

Инструкция по эксплуатации:
Версия ED7735_IFU_v1_EN
Дата издания: 13-12-2022

Символы

IVD	Медицинское устройство для диагностики in vitro		Температурный режим
CE	Маркировка соответствия CE		Беречь от солнечного света
	Производитель	UKCA	Знак UKCA
UDI	Уникальный идентификатор устройства		
	Ознакомьтесь с инструкцией по использованию		
Σ	Содержит достаточно для <n> тестов		
REF	Номер по каталогу		
LOT	Код партии		
	Использовать до		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Назначение

КОМБИТЕСТ B/NK Cell 4-color предназначен для выявления и подсчета популяций и субпопуляций лимфоцитов в цельной крови человека методом проточной цитометрии.

Что обнаруживается и/или измеряется

Прибор KOMBITEST B/NK Cell 4-color обнаруживает и измеряет относительное процентное и абсолютное количество Т-клеток человека (CD3+), В-клеток (CD3-CD19+) и NK-клеток (CD3-CD16+56+).

Функция устройства

Устройство предназначено для использования при иммунологической оценке здоровых пациентов и может помочь в диагностике пациентов, имеющих или подозреваемых в наличии иммунодефицита.

Контекст физиологического или патологического состояния

На частоту популяций лимфоцитов, измеряемую устройством, могут влиять различные патологические состояния, а оценка их процентного содержания и количества может использоваться при оценке:

• наследственные иммунодефициты [1, 7]
• аутоиммунные заболевания [2]
• дефекты врожденной иммунной защиты [4, 5]

Тип анализа

Не автоматизировано
Количественный

Требуемый тип образца

Образец периферической цельной крови человека с антикоагулянтами

Тестируемая популяция

Не предназначен для конкретной группы населения.

2. Предполагаемый пользователь

Устройство предназначено только для профессионального лабораторного использования. Не для тестирования у пациента или самотестирования.

Требования к квалификации

Предполагаемый пользователь должен обладать новейшими знаниями в области анализа клеток человека методом проточной цитометрии, стандартными лабораторными методами, включая навыки пипетирования, безопасного и надлежащего обращения с образцами, полученными из человеческого тела. Предполагаемый пользователь должен соответствовать стандарту EN ISO 15189 или другим национальным стандартам, где это применимо.

3. Принцип тестирования

Принцип теста основан на обнаружении связывания моноклональных антител со специфической молекулой (антигеном), экспрессируемой определенными клетками крови человека. Моноклональные антитела, используемые в тесте, помечены различными флуорохромами, которые возбуждаются лазерным лучом проточного цитометра во время получения образца крови, окрашенного антителами. Последующая флуоресценция (излучение света) каждого флуорохрома, присутствующего на полученной клетке крови, собирается и анализируется прибором. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна плотности экспрессии антигена в клетке, что позволяет разделять различные подмножества клеток.

4. Реагент(ы) предоставлен(ы)

Содержание

Прибор KOMBITEST B/NK Cell 4-color рассчитан на 50 тестов и снабжен следующим реагентом:

1 флакон (1 мл), содержащий предварительно смешанную комбинацию меченных флуорохромом моноклональных антител CD3 FITC / CD16 PE + CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC, разведенных в оптимальных концентрациях в стабилизирующем фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), содержащем 15 мМ азида натрия.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Состав

Таблица 1 Описание активных компонентов

Антиген	Флюорохром	Клон	Изотип	Концентрация (мкг/мл)
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. Материалы (не входят в комплект)

Пробироки с круглым дном диаметром 12x75 мм

Раствор для лизирования эритроцитов (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., кат. номер ED7066 или CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, кат. номер BD303500)

Деионизированная вода (х.ч.)

Клетки для контроля процесса (Streck CD-Chex Plus®, кат. № 213323 или эквивалентный контроль лизируемых клеток)

6. Необходимое оборудование

Автоматическая пипетка с одноразовыми наконечниками (20–100 мкл) для дозирования образцов и реагентов.

Дозатор жидкости или пипетка с одноразовыми наконечниками (0,5–2 мл) для дозирования раствора, лизирующего эритроциты.

Вихревой смеситель

Гематологический анализатор (для абсолютного количества клеток), позволяющий определять количество лейкоцитов (лейкоцитов) и лимфоцитов на мкл образца

Проточный цитометр с двумя источниками лазерного возбуждения (488 нм и ~635 нм), детекторами рассеянного света, оптическими фильтрами и детекторами эмиссии, подходящими для сбора сигналов от флуорохромов, представлен в таблице 2.

Таблица 2 Спектральная характеристика флуорохромов, используемых в приборе

Флюорохром	Возбуждение (нм)	Эмиссия (нм)
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP	488	677
APC	630 – 640	660

ВНИМАНИЕ. Устройство было протестировано на проточных цитометрах BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) и Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Хранение и обращение.

Хранить при температуре 2–25 °C.

Избегайте длительного воздействия света.

Не замораживать.

См. раздел 10 «Процедура (приготовление реагентов)» для получения информации о стабильности при использовании и сроке хранения после первого открытия, а также об условиях хранения и стабильности рабочих растворов (если применимо).

8. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования

Классификация опасностей СГС

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Обратитесь к паспорту безопасности (SDS), доступному на странице продукта на сайте www.exbio.cz, для получения полной информации о рисках, связанных с химическими веществами и смесями, содержащимися в продукте, а также о том, как с ними следует обращаться и утилизировать.

Биологическая опасность

Биологические образцы человека, образцы крови и любые материалы, вступающие с ними в контакт, всегда считаются инфекционными материалами.

Используйте средства индивидуальной защиты и обеспечения безопасности, чтобы избежать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

Соблюдайте все применимые законы, правила и процедуры по обращению и утилизации инфекционных материалов.

Свидетельства ухудшения

Обычно поставляемый реагент выглядит как прозрачная жидкость. Не используйте реагент, если вы заметили какие-либо изменения во внешнем виде, например, помутнение или признаки выпадения осадка.

Ограничение использования

Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке продукта.

9. Образец

Используйте венозную периферическую кровь, собранную в сосуд для образцов, классифицированный как медицинское устройство, с антикоагулянтом ЭДТА или гепарином.

> **ВНИМАНИЕ.** Определите абсолютное количество клеток WBC и количество лимфоцитов в собранном образце крови с помощью гематологического анализатора. Прибор KOMBITEST B/NK Cell 4-color сам по себе не обеспечивает подсчет абсолютного количества клеток.

Образец крови с количеством лейкоцитов, превышающим $40x10^3$ клеток/мкл, перед обработкой образца необходимо разбавить PBS.

Обрабатывайте образец крови не позднее, чем через 24 часа после сбора.

10. Процедура

Приготовление предоставленного реагента(ов)

Никакой подготовки реагента не требуется.

Перед использованием доведите реагент до комнатной температуры. Держите основной контейнер устройства сухим.

Используйте реагент непосредственно из оригинального первичного контейнера. Время использования реагента (под воздействием света и повышенной температуры) не должно превышать 4 часов в сутки.

После первого вскрытия реагент сохраняет свои эксплуатационные характеристики до истечения срока годности при хранении в заявленных условиях в оригинальной первичной упаковке.

> **ВНИМАНИЕ:** Не разбавляйте реагент.

Подготовка необходимых, но не предоставляемых материалов

Разбавьте концентрированный раствор для лизирования эритроцитов деионизированной водой в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный (1X) раствор для лизирования эритроцитов стабилен в течение 1 месяца при хранении в дозаторе для жидкости или закрытом контейнере при комнатной температуре.

Контроль качества

Используйте Streck CD-Chex Plus® или эквивалентные контрольные ячейки в качестве положительного процедурного контроля, чтобы гарантировать правильную работу устройства по назначению. Streck CD-Chex Plus® обеспечивает установленные значения процентного положительного и абсолютного количества Т-клеток, В-клеток, гранулоцитов, моноцитов и NK-клеток, включая два клинически значимых уровня CD4+ клеток.

Окрасьте контрольные клетки с помощью 4-цветного реагента KOMBITEST B/NK Cell в соответствии с обработкой проб, указанной в инструкции по эксплуатации. Убедитесь, что полученные результаты (%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

положительных клеток) находятся в пределах ожидаемого диапазона, указанного для использованной партии контрольных клеток.

Окрашивание образцов

1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Внесите 20 мкл реагента KOMBITEST B/NK Cell 4-color на дно пробирки размером 12 x 75 мм.
3. Нанесите пипеткой 50 мкл хорошо перемешанного образца крови на дно пробирки.

   ВНИМАНИЕ: Не допускайте попадания крови на стенку пробирки. Если мазок или капля крови останется на стенке пробирки, возможно, они не окрашены реагентом или эритроциты не лизируются, и результат теста может оказаться недействительным.
4. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.
5. Добавьте в пробирку 500 мкл разбавленного (1X) лизирующего раствора.
6. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте.

Немедленно соберите окрашенный образец на проточном цитометре. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, храните его при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 24 часов.

ВНИМАНИЕ: Встряхивайте окрашенный образец непосредственно перед сбором на проточном цитометре, чтобы избежать образования агрегатов.

Анализ проточной цитометрии

Проточный цитометр, выбранный для использования с прибором KOMBITEST B/NK Cell 4color, необходимо регулярно калибровать с использованием флуоресцентных микрогранул для обеспечения стабильной чувствительности детекторов в соответствии с инструкциями производителя цитометра.

При неправильном обслуживании проточный цитометр может давать ложные результаты.

См. технические характеристики цитометров производителя лазеров и детекторов флуоресценции в соответствии с характеристиками возбуждения и излучения флуорохромов в разделе 6 «Необходимое оборудование».

Установите напряжение на интересующих детекторах флуоресценции перед анализом окрашенных образцов. Напряжение на детекторе ФЭУ должно быть установлено достаточно высоким, чтобы минимум событий отрицательного окрашивания мешал 0-му каналу на оси флуоресценции. Также напряжение детектора ФЭУ не должно превышать значений, при которых положительные события смещаются к правой оси.

Компенсируйте сигналы флуоресценции между детекторами до или после сбора данных. Данные могут быть неправильно интерпретированы, если сигналы флуоресценции компенсируются неправильно или ворота расположены неточно.

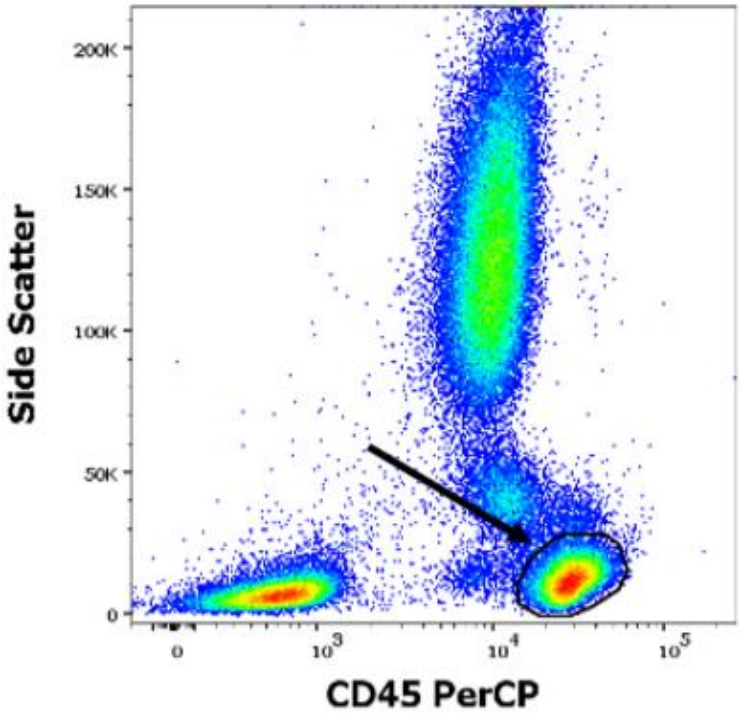
Для анализа измеренных данных можно использовать программное обеспечение цитометра, разработанное производителем, или программное обеспечение, предназначенное для автономного анализа данных цитометрии (например, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Анализ данных KOMBITEST B/NK Cell, окрашенного в 4 цвета образца

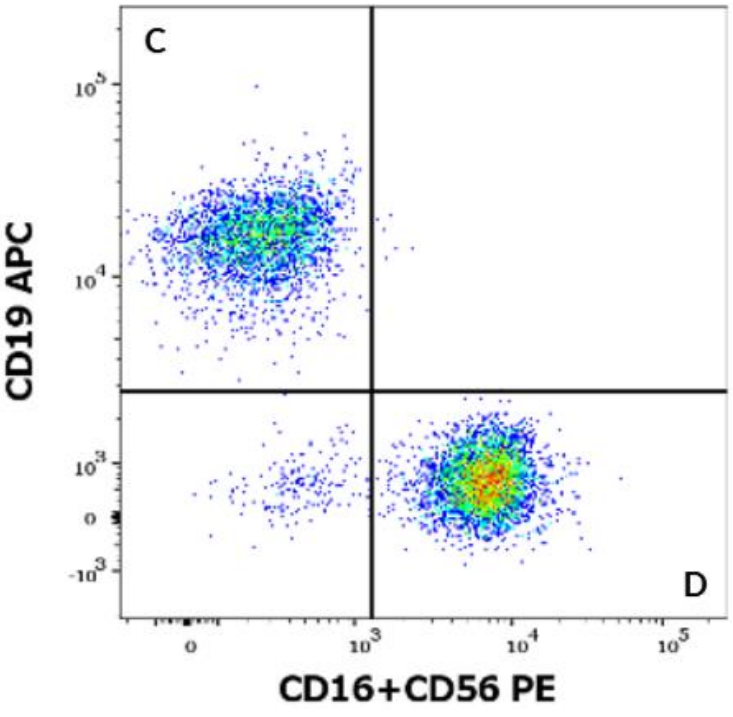
Визуализируйте компенсированные данные на графике бокового рассеяния (SSC) в зависимости от CD45 PerCP. Установите ворота для популяции CD45+ лимфоцитов, как показано на рисунке 1.

Рисунок 1. Разграничение популяции CD45+ лимфоцитов.



Нанесите на график закрытые CD3-лимфоциты (область A на рисунке 2) как CD19 APC в сравнении с CD16+CD56 PE, как показано на рисунке 3. Установите соответствующие ворота и рассчитайте процент B-клеток (CD16-CD56-CD19+; область C на рисунке). 3) и естественные клетки-киллеры (NK) (CD16+CD56+CD19-; область D на рисунке 3) из всех лимфоцитов.

Рисунок 3. CD3-лимфоциты на точечной диаграмме CD19 APC в сравнении с CD16+CD56 PE.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Расчет и интерпретация аналитических результатов

Чтобы получить абсолютные значения, используйте абсолютное количество лимфоцитов, определенное гематологическим анализатором. См. инструкции производителя гематологического анализатора. Используйте приведенные ниже уравнения для абсолютного подсчета необходимого подмножества лимфоцитов.

$$A \times \frac{B(\%)}{100\ (\%)} = \text{абсолютное количество необходимой субпопуляции лимфоцитов}$$

A = абсолютное количество лимфоцитов (данные гематологического анализатора; клеток/мкл)

B = относительные проценты необходимой субпопуляции лимфоцитов от всех лимфоцитов (данные проточного цитометра; %)

11. Аналитическая деятельность

ВНИМАНИЕ: Все аналитические данные были измерены с использованием раствора для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., кат. номер ED7066).

Специфика

Антитело TB3 распознает человеческий антиген CD3 комплекса TCR/CD3. Специфичность антитела была подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA X и HLDA XI).

Антитело 3G8 распознает человеческий антиген CD16 (низкоаффинный Fc-гамма-рецептор иммуноглобулина III типа). Специфичность антитела была подтверждена семинаром HLDA (семинар HLDA V [6]).

Антитело LT56 распознает лейкоцитарную изоформу человеческого антигена CD56 (молекула адгезии нервных клеток 1). Специфичность антитела подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA X).

Антитело LT19 распознает человеческий антиген CD19 (трансмембранный гликопротеин B-клеток CD19). Специфичность антитела подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA X).

Антитело MEM-28 распознает все изоформы лейкоцитов человеческого CD45 (рецептор протеинтирозинфосфатазы типа C). Специфичность антитела была подтверждена семинаром HLDA (семинар HLDA III [3]).

Точность

Точность метода определялась путем сравнения прибора KOMBITEST B/NK Cell 4-color с аналогичными продуктами, доступными на рынке, или с другими хорошо документированными методами путем параллельного окрашивания 30 здоровых доноров и 81 пациента с подозрением на патологию иммунной системы. состояние. Параметры линейного регрессионного анализа представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Линейный регрессионный анализ субпопуляций лимфоцитов здоровых доноров (сравнение прибора KOMBITEST B/NK Cell 4-color с продуктом IVD BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (Кат. № 342416))

Подвид лимфоцитов	Единица	n	Склон	Перехват	R^2	Диапазон
CD3+	%	30	1.01	-0.010	1.00	50.47 – 85.47
	кл/мкл	30	1.00	-0.721	1.00	627 - 2184
CD3-CD16+CD56+	%	30	1.01	-0.001	1.00	5.29 – 35.77
	кл/мкл	30	1.01	-0.805	1.00	85 - 992
CD3-CD19+	%	30	0.99	0.002	1.00	5.19 – 26.10
	кл/мкл	30	0.99	3.190	0.99	71 - 331

n = количество образцов крови

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4. Линейный регрессионный анализ субпопуляций лимфоцитов у пациентов с подозрением на патологические состояния иммунной системы (сравнение прибора KOMBITEST B/NK Cell 4-color с системой проточной цитометрии AQUIOS CL - Beckman Coulter, Inc. и коктейлем одноцветных конъюгированных антител от разных производителей и анализ на BD FACSCanto™ II) Lymphocyte

Подвид лимфоцитов	Единица	n	Склон	Перехват	R^2	Диапазон
CD3+	%	81	1.042	-2.976	0.97	23.4 – 93.6
	кл/мкл	81	1.005	-0.010	1.00	140 - 5178
CD3-CD16+CD56+	%	81	1.061	-0.626	0.98	1.6 – 66.7
	кл/мкл	81	1.078	-0.017	0.99	10 - 2555
CD3-CD19+	%	81	1.023	-0.163	0.99	0.0 – 69.7
	кл/мкл	81	1.032	-0.006	1.00	0 - 4586

Линейность

Линейность метода была проверена на 10 серийных разведениях образца крови, обогащенного лейкоцитами (лейкоцитарная пленка). Образцы клеток окрашивали KOMBITEST B/NK Cell 4-color в гексапликатах. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Результаты измерений для указанных подгрупп лимфоцитов были линейными в диапазоне лимфоцитов 368–10634 клеток/мкл при использовании BD FACSCanto™ II и 328–9061 клеток/мкл при использовании Beckman Coulter DxFLEX. Подмножества клеток находились в диапазонах, указанных в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Линейные диапазоны субпопуляций лимфоцитов, анализируемых с помощью BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	
Подвид лимфоцитов	Диапазон (кл/мкл)
CD3+	227 - 6163
CD3-CD16+CD56+	59 - 1609
CD3-CD19+	34 - 912

Таблица 6. Линейные диапазоны субпопуляций лимфоцитов, проанализированные с помощью Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX	
Подвид лимфоцитов	Диапазон (кл/мкл)
CD3+	217 - 6051
CD3-CD16+CD56+	69 - 1669
CD3-CD19+	33 - 889

Повторяемость

Повторяемость анализа измеряли на десяти образцах крови в шести повторностях. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Коэффициенты вариации (CV) представлены в таблицах ниже (Таблицы 7 и 8).

Таблица 7. Повторяемость устройства на BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Подвид лимфоцитов	**Единица**	**n**	**Среднее**	**SD**	**%CV**
CD3+	%	10	66.47	0.29	0.44
	кл/мкл	10	1362	6.19	0.44
CD3-CD16+CD56+	%	10	18.66	0.21	1.26
	кл/мкл	10	374	4.36	1.26
CD3-CD19+	%	10	13.69	0.20	1.57
	кл/мкл	10	284	4.35	1.57

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 8. Повторяемость устройства на Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX					
Подвид лимфоцитов	**Единица**	**n**	**Среднее**	**SD**	**%CV**
CD3+	%	10	65.99	0.59	0.92
	кл/мкл	10	1352	11.67	0.92
CD3-CD16+CD56+	%	10	19.08	0.44	2.44
	кл/мкл	10	382	8.62	2.44
CD3-CD19+	%	10	13.55	0.34	2.59
	кл/мкл	10	281	6.73	2.59

Воспроизводимость

Воспроизводимость анализа измерялась на двух стабилизированных образцах крови (CD-Chex Plus® и CD-Chex Plus® CD4 Low) в одинаковых условиях в течение 15 дней с использованием 3 партий Прибора (по 5 дней каждая). Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Коэффициенты вариации (CV) приведены в таблицах ниже (табл. 9 и 10).

Таблица 9. Воспроизводимость устройства на BD FACSCanto™ II

Подвид лимфоцитов	Материал	Единица	Среднее	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	77.39	0.24	0.31
		кл/мкл	1909	5.97	0.31
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	61.38	0.55	0.90
		кл/мкл	891	8.04	0.90
CD3-CD16+CD56+	CD-Chex Plus®	%	10.57	0.19	1.84
		кл/мкл	261	4.81	1.84
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.28	0.46	2.37
		кл/мкл	280	6.64	2.37
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11.20	0.13	1.13
		кл/мкл	276	3.12	1.13
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	17.95	0.38	2.13
		кл/мкл	261	5.55	2.13

Таблица 10. Воспроизводимость устройства на Beckman Coulter DxFLEX

Подвид лимфоцитов	Материал	Единица	Среднее	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76.77	0.27	0.36
		кл/мкл	1894	6.77	0.36
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60.53	0.38	0.62
		кл/мкл	878	5.45	0.62
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	10.83	0.21	1.96
		кл/мкл	267	5.23	1.96
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.54	0.31	1.61
		кл/мкл	284	4.55	1.61
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	11.36	0.23	2.03
		кл/мкл	280	5.68	2.03
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	18.23	0.43	2.38
		кл/мкл	265	6.31	2.38

12. Клинические характеристики

Пациенты с приобретенным иммунодефицитом

Клинические данные были собраны в клинической базе о 53 пациентах с подтвержденной инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Клинические характеристики устройства определялись путем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сравнения использования устройства KOMBITEST T Cell 4-color с раствором для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Cat. No. ED7066) с собственным методом аккредитованной клинической лаборатории (коктейль из одноцветные конъюгированные антитела от разных производителей и анализ на BD FACSCanto™ II).
Результаты оценки иммунного статуса пациентов оценивали на наличие иммунодефицита (табл. 11).

Таблица 11. Клинические характеристики аппарата KOMBITEST T Cell 4-color – пациенты с ВИЧ

		Иммунный статус оценивается собственным методом аккредитованной клинической лаборатории.	
		Иммунная недостаточность	Нормальное состояние
Иммунный статус по данным прибора E D7735 КОМБИТЕСТ Б/Н К Ячейка 4-цвет	Иммунная недостаточность	23 пациента	0 пациентов
	Нормальное состояние	0 пациентов	7 пациентов

13. Ожидаемые значения

Контрольный интервал

Референтные интервалы для устройства KOMBITEST B/NK Cell 4 color определялись у группы пациентов с использованием раствора для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Кат. № ED7066) и проточного цитометра BD FACSCanto™. Субъектами были здоровые взрослые люди (доноры крови).

Таблица 12 Репрезентативные референтные интервалы для KOMBITEST B/NK Cell 4-цвет

Подвид лимфоцитов	Единица	n	Значение	95% Диапазон
CD3+	%	30	69.33	49.24 – 89.43
	кл/мкл	30	1293	524 – 2062
CD3-CD16+CD56+	%	30	18.18	0.23 – 36.12
	кл/мкл	30	349	0 – 802
CD3-CD19+	%	30	11.75	2.26 – 21.23
	кл/мкл	30	209	80 - 228

ВНИМАНИЕ: Значения, указанные при использовании устройства, являются лишь репрезентативными. Каждая лаборатория должна установить свои собственные референтные интервалы для местной популяции нормальных доноров.

14. Мешающие вещества и ограничения

Устройство KOMBITEST B/NK Cell 4-color не было одобрено для использования в образцах, собранных с антикоагулянтами гепарин или цитрат-декстроза (ACD) при определении относительных и абсолютных показателей.
Прибор КОМБИТЕСТ B/NK Cell 4-color не предназначен для скрининга и/или фенотипирования образцов лейкемии и лимфомы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Абсолютные значения несопоставимы между лабораториями, использующими различное оборудование разных производителей.

15. Ссылки

1) Болдт А. и др. Восьмицветное иммунофенотипирование субпопуляций T-, B- и NK-клеток для характеристики хронических иммунодефицитов. Цитометрия B Clin Cytom. Май 2014 г.;86(3):191-206. doi: 10.1002/cyto.b.21162.
2) Кучуксезер, Ю.С. и др. Роль естественных клеток-киллеров в аутоиммунных заболеваниях. Фронт Иммунол. 2021, 25 февраля; 12: 622306. дои: 10.3389/fimmu.2021.622306.
3) МакМайкл А.Дж., изд. Типирование лейкоцитов III: 54 антигена дифференцировки лейкоцитов. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк: Издательство Оксфордского университета; 1987.
4) Оранж, Дж. С. Дефицит естественных клеток-киллеров. J Аллергия Клин Иммунол. Сентябрь 2013 г.; 132(3): 515–525. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.020.
5) Оранж, Дж. С. Как я справляюсь с дефицитом естественных клеток-киллеров. Дж Клин Иммунол. Январь 2020 г.;40(1):13–23. дои: 10.1007/s10875-019-00711-7.
6) Шлоссман С.Ф., Бумселл Л., Гилкс В. и др., ред.: Типирование лейкоцитов V: Антигены дифференцировки лейкоцитов. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк: Издательство Оксфордского университета; 1995.
7) ван Донген, Дж. Дж. М. и др. Проточно-цитометрический диагностический скрининг и классификация первичных иммунодефицитов лимфоидной системы на основе EuroFlow. Фронт Иммунол. 2019, 13 июня; 10: 1271. дои: 10.3389/fimmu.2019.01271.

16. Товарные знаки

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ и FlowJo™ — зарегистрированные торговые марки Becton, Dickinson and Company, CD-Chex Plus® — зарегистрированная торговая марка Streck, Sysmex™ — зарегистрированная торговая марка Sysmex Corporation, VenturiOne® — зарегистрированная торговая марка. торговая марка Applied Cytometry, Infinicyt™ является зарегистрированной торговой маркой Cytognos S.L..

17. История изменений

Версия 1, ED7735_IFU_v1
Начальная версия

18. Производитель

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

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

19. Уполномоченные представители

Ответственное лицо в Великобритании Сисмекс ЮК Лтд.

Сисмекс Хаус
Гарамонд Драйв
Уимбуш
Милтон Кейнс
МК8 8ДФ
Великобритания
+44 (0)333 3203460
info@sysmex.co.uk

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ: О любом серьезном происшествии, произошедшем с устройством, необходимо сообщать производителю и местному компетентному органу.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

KOMBITEST T CELL 4-COLOR
50 тестов | Кат.Ном. **ED7734**

IVD CE

Инструкция по эксплуатации:
Версия ED7734_IFU_v1_EN
Дата издания: 13-12-2022

Символы

IVD	Медицинское устройство для диагностики in vitro		Температурный режим
CE	Маркировка соответствия CE		Беречь от солнечного света
	Производитель	UKCA	Знак UKCA
UDI	Уникальный идентификатор устройства		
	Ознакомьтесь с инструкцией по использованию		
Σ	Содержит достаточно для <n> тестов		
REF	Номер по каталогу		
LOT	Код партии		
	Использовать до		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Назначение

KOMBITEST T Cell 4-color предназначен для обнаружения и подсчета популяций и субпопуляций лимфоцитов в цельной крови человека методом проточной цитометрии.

Что обнаруживается и/или измеряется

Прибор KOMBITEST T Cell 4-color обнаруживает и измеряет относительное процентное и абсолютное количество Т-клеток человека (CD3+), хелперных/индукторных (CD3+CD4+) и супрессорных/цитотоксических (CD3+CD8+) подмножеств Т-клеток.

Функция устройства

Устройство предназначено для использования при иммунологической оценке здоровых пациентов и может помочь в диагностике пациентов, имеющих или подозреваемых в наличии иммунодефицита.

Контекст физиологического или патологического состояния

На частоту популяций лимфоцитов, измеряемую устройством, могут влиять различные патологические состояния, а оценка их процентного содержания и количества может использоваться для оценки:

• прогрессирования инфекции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [1, 4, 6, 8]

• наследственных иммунодефициты [2, 3, 4, 10, 11, 12, 14]

• аутоиммунные заболевания [5]

Тип анализа

Не автоматизировано

Количественный

Требуемый тип образца

Образец периферической цельной крови человека с антикоагулянтами

Тестируемая популяция

Не предназначен для конкретной группы населения.

2. Предполагаемый пользователь

Устройство предназначено только для профессионального лабораторного использования. Не для тестирования у пациента или самотестирования.

Требования к квалификации

Предполагаемый пользователь должен обладать новейшими знаниями в области анализа клеток человека методом проточной цитометрии, стандартными лабораторными методами, включая навыки пипетирования, безопасного и надлежащего обращения с образцами, полученными из человеческого тела.

Предполагаемый пользователь должен соответствовать стандарту EN ISO 15189 или другим национальным стандартам, где это применимо.

3. Принцип тестирования

Принцип теста основан на обнаружении связывания моноклональных антител со специфической молекулой (антигеном), экспрессируемой определенными клетками крови человека. Моноклональные антитела, используемые в тесте, помечены различными флуорохромами, которые возбуждаются лазерным лучом проточного цитометра во время получения образца крови, окрашенного антителами. Последующая флуоресценция (излучение света) каждого флуорохрома, присутствующего на полученной клетке крови, собирается и анализируется прибором. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна плотности экспрессии антигена в клетке, что позволяет разделять различные подмножества клеток.

4. Реагент(ы) в комплекте

Содержимое

Прибора KOMBITEST T Cell 4-color хватает на 50 тестов и он снабжен следующим реагентом:

1 флакон (1 мл), содержащий предварительно смешанную комбинацию меченных флуорохромом моноклональных антител CD3 FITC / CD45 PerCP / CD4 APC / CD8 PE, разведенных в оптимальных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

концентрациях в стабилизирующем фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), содержащем 15 мМ азида натрия.

Состав

Таблица 1 Описание активных компонентов

Антиген	Флюорохром	Клон	Изотип	Концентрация (мкг/мл)
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. Материалы (не входят в комплект)

Пробироки с круглым дном диаметром 12x75 мм

Раствор для лизирования эритроцитов (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., кат. номер ED7066 или CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, кат. номер BD303500)

Деионизированная вода (х.ч.)

Клетки для контроля процесса (Streck CD-Chex Plus®, кат. № 213323 или эквивалентный контроль лизируемых клеток)

6. Необходимое оборудование

Автоматическая пипетка с одноразовыми наконечниками (20–100 мкл) для дозирования образцов и реагентов.

Дозатор жидкости или пипетка с одноразовыми наконечниками (0,5–2 мл) для дозирования раствора, лизирующего эритроциты.

Вихревой смеситель

Гематологический анализатор (для абсолютного количества клеток), позволяющий определять количество лейкоцитов (лейкоцитов) и лимфоцитов на мкл образца

Проточный цитометр с двумя источниками лазерного возбуждения (488 нм и ~635 нм), детекторами рассеянного света, оптическими фильтрами и детекторами эмиссии, подходящими для сбора сигналов от флуорохромов, представлен в таблице 2.

Таблица 2 Спектральная характеристика флуорохромов, используемых в приборе

Флюорохром	Возбуждение (нм)	Эмиссия (нм)
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP	488	677
APC	630 – 640	660

ВНИМАНИЕ. Устройство было протестировано на проточных цитометрах BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) и Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Хранение и обращение.

Хранить при температуре 2–25 °C.

Избегайте длительного воздействия света.

Не замораживать.

См. раздел 10 «Процедура (приготовление реагентов)» для получения информации о стабильности при использовании и сроке хранения после первого открытия, а также об условиях хранения и стабильности рабочих растворов (если применимо).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования

Классификация опасностей СГС

Обратитесь к паспорту безопасности (SDS), доступному на странице продукта на сайте www.exbio.cz, для получения полной информации о рисках, связанных с химическими веществами и смесями, содержащимися в продукте, а также о том, как с ними следует обращаться и утилизировать.

Биологическая опасность

Биологические образцы человека, образцы крови и любые материалы, вступающие с ними в контакт, всегда считаются инфекционными материалами.

Используйте средства индивидуальной защиты и обеспечения безопасности, чтобы избежать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

Соблюдайте все применимые законы, правила и процедуры по обращению и утилизации инфекционных материалов.

Свидетельства ухудшения

Обычно поставляемый реагент выглядит как прозрачная жидкость. Не используйте реагент, если вы заметили какие-либо изменения во внешнем виде, например, помутнение или признаки выпадения осадка.

Ограничение использования

Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке продукта.

9. Образец

Используйте венозную периферическую кровь, собранную в сосуд для образцов, классифицированный как медицинское устройство, с антикоагулянтом ЭДТА или гепарином.

> **ВНИМАНИЕ.** Определите абсолютное количество лейкоцитов и количество лимфоцитов в собранном образце крови с помощью гематологического анализатора. Прибор KOMBITEST T Cell 4-color сам по себе не обеспечивает подсчет абсолютного количества клеток.

Образец крови с количеством лейкоцитов, превышающим 40x103 клеток/мкл, перед обработкой образца необходимо разбавить PBS.

Обрабатывайте образец крови не позднее, чем через 24 часа после сбора.

10. Процедура

Приготовление предоставленного реагента(ов)

Никакой подготовки реагента не требуется.

Перед использованием доведите реагент до комнатной температуры. Держите основной контейнер устройства сухим.

Используйте реагент непосредственно из оригинального первичного контейнера. Время использования реагента (под воздействием света и повышенной температуры) не должно превышать 4 часов в сутки. После первого вскрытия реагент сохраняет свои эксплуатационные характеристики до истечения срока годности при хранении в заявленных условиях в оригинальной первичной упаковке.

> **ВНИМАНИЕ:** Не разбавляйте реагент.

Подготовка необходимых, но не предоставляемых материалов

Разбавьте концентрированный раствор для лизирования эритроцитов деионизированной водой в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный (1X) раствор для лизирования эритроцитов стабилен в течение 1 месяца при хранении в дозаторе для жидкости или закрытом контейнере при комнатной температуре.

Контроль качества

Используйте Streck CD-Chex Plus® или эквивалентные контрольные ячейки в качестве положительного процедурного контроля, чтобы гарантировать правильную работу устройства по назначению. Streck CD-Chex Plus® обеспечивает установленные значения процентного положительного и абсолютного количества Т-клеток, В-клеток, гранулоцитов, моноцитов и NK-клеток, включая два клинически значимых уровня CD4+ клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Окрасьте контрольную кровь с помощью 4-цветного реагента KOMBITEST T Cell в соответствии с обработкой проб, указанной в инструкции по эксплуатации. Убедитесь, что полученные результаты (% положительных клеток) находятся в пределах ожидаемого диапазона, указанного для использованной партии контрольных клеток.

Окрашивание образцов

1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Нанесите пипеткой 20 мкл реагента KOMBITEST T Cell 4-color на дно пробирки размером 12 x 75 мм.
3. Нанесите пипеткой 50 мкл хорошо перемешанного образца крови на дно пробирки.

   ВНИМАНИЕ: Не допускайте попадания крови на стенку пробирки. Если мазок крови или капли остаются на стенках пробирки, возможно, они не окрашены реагентом или эритроциты не лизируются, и результат теста может быть недействительным.
4. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.
5. Добавьте в пробирку 500 мкл разбавленного (1X) лизирующего раствора.
6. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте.

Немедленно соберите окрашенный образец на проточном цитометре. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, храните его при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 24 часов.

ВНИМАНИЕ: Встряхивайте окрашенный образец непосредственно перед сбором на проточном цитометре, чтобы избежать образования агрегатов.

Анализ проточной цитометрии

Проточный цитометр, выбранный для использования с прибором KOMBITEST T Cell 4-color, необходимо регулярно калибровать с использованием флуоресцентных микрогранул для обеспечения стабильной чувствительности детекторов в соответствии с инструкциями производителя цитометра. При неправильном обслуживании проточный цитометр может давать ложные результаты.

См. технические характеристики цитометров производителя лазеров и детекторов флуоресценции в соответствии с характеристиками возбуждения и излучения флуорохромов в разделе 6 «Необходимое оборудование».

Установите напряжение на интересующих детекторах флуоресценции перед анализом окрашенных образцов. Напряжение на детекторе ФЭУ должно быть установлено достаточно высоким, чтобы минимум событий отрицательного окрашивания мешал 0-му каналу на оси флуоресценции. Также напряжение детектора ФЭУ не должно превышать значений, при которых положительные события смещаются к правой оси.

Компенсируйте сигналы флуоресценции между детекторами до или после сбора данных. Данные могут быть неправильно интерпретированы, если сигналы флуоресценции компенсируются неправильно или ворота расположены неточно.

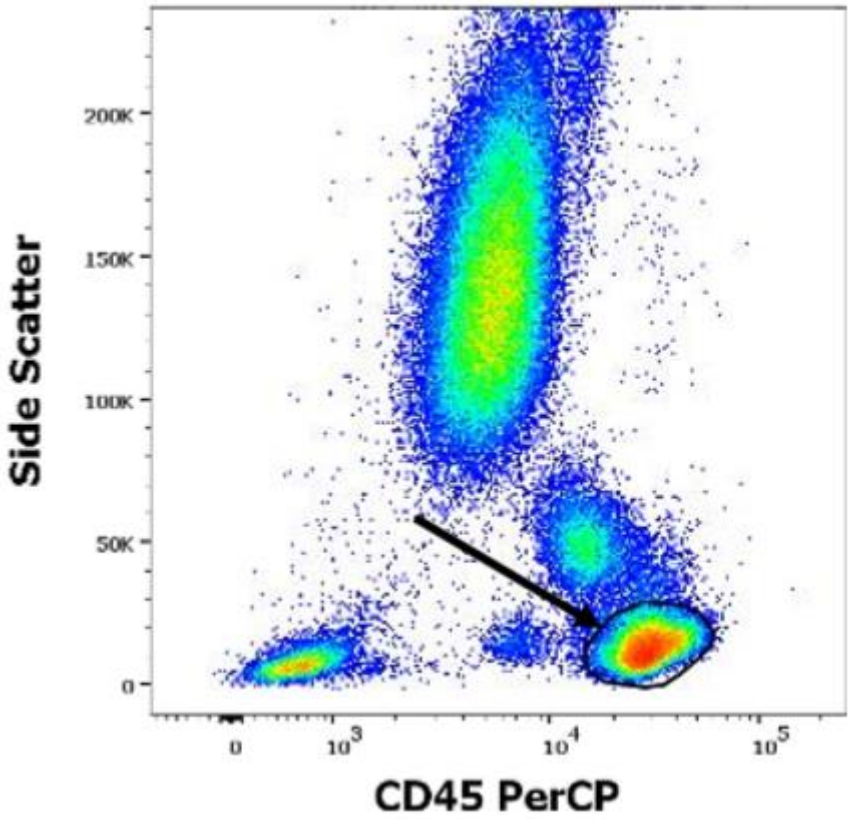
Для анализа измеренных данных можно использовать программное обеспечение цитометра, разработанное производителем, или программное обеспечение, предназначенное для автономного анализа данных цитометрии (например, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Анализ данных окрашенного в 4 цвета образца KOMBITEST T Cell

Визуализируйте компенсированные данные на графике бокового рассеяния (SSC) в зависимости от CD45 PerCP. Установите ворота для популяции CD45+ лимфоцитов, как показано на рисунке 1.

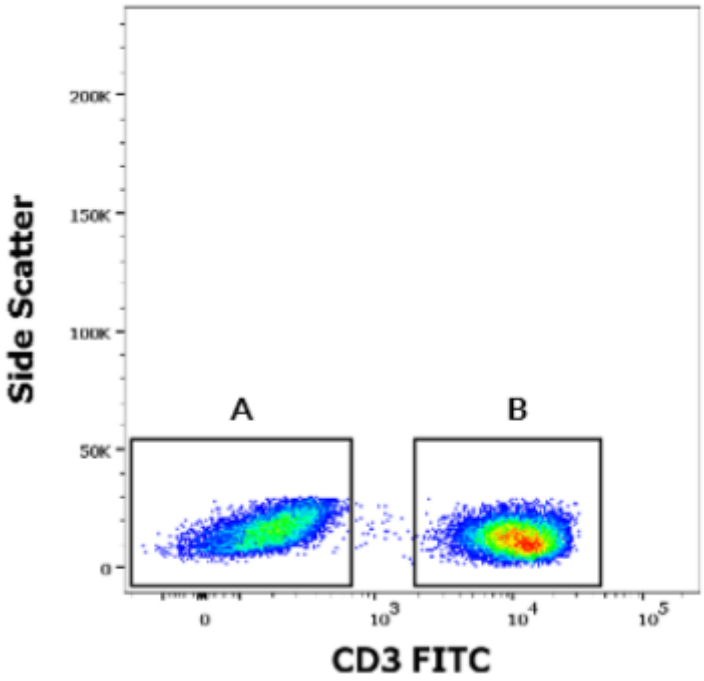
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Разграничение популяции CD45+ лимфоцитов.



Постройте закрытые лимфоциты CD45+ на графике бокового рассеяния (SSC) и CD3 FITC, как показано на рисунке 2. Отдельные CD3+ и CD3- лимфоциты, используя соответствующие ворота. Рассчитайте процент Т-клеток (CD3+; область B на рисунке 2) от всех лимфоцитов.

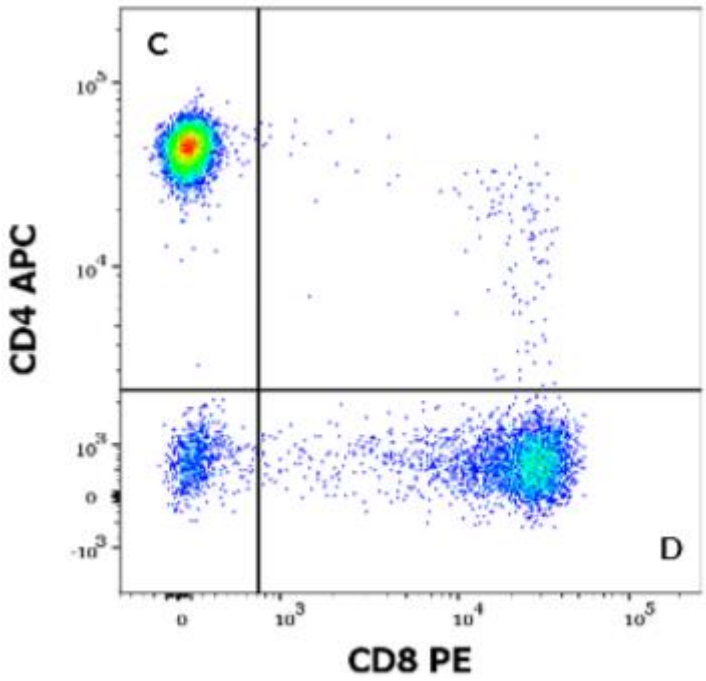
Рисунок 2. Разделение CD3+ и CD3- лимфоцитов.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Нанесите на график закрытые Т-клетки (CD3+; область B на рисунке 2) как CD4 APC в сравнении с CD8 PE, как показано на рисунке 3. Установите соответствующие ворота и рассчитайте процент Т-хелперов/индукторов Т-клеток (CD4+CD8-; область C на рисунке 3). Рисунок 3) и супрессорные/цитотоксические Т-клетки (CD4-CD8+; область D на рисунке 3) из всех лимфоцитов.

Рисунок 3. CD3+ лимфоциты на точечной диаграмме CD4 APC и CD8 PE.



Расчет и интерпретация аналитических результатов

Чтобы получить абсолютные значения, используйте абсолютное количество лимфоцитов, определенное гематологическим анализатором. См. инструкции производителя гематологического анализатора. Используйте приведенные ниже уравнения для абсолютного подсчета необходимого подмножества лимфоцитов.

$$\boldsymbol{A} \times \frac{\boldsymbol{B}(\%)}{\mathbf{100}\ (\%)} = \text{абсолютное количество необходимой субпопуляции лимфоцитов}$$

A = абсолютное количество лимфоцитов (данные гематологического анализатора; клеток/мкл)
B = относительные проценты необходимой субпопуляции лимфоцитов от всех лимфоцитов (данные проточного цитометра; %)

11. Аналитическая деятельность

ВНИМАНИЕ: Все аналитические данные были измерены с использованием раствора для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., кат. номер ED7066).

Специфика

Антитело TB3 распознает человеческий антиген CD3 комплекса TCR/CD3. Специфичность антитела была подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA X и HLDA XI).
Антитело MEM-241 распознает человеческий антиген CD4 (гликопротеин CD4 поверхности Т-клеток). Специфичность антитела подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA VIII).
Антитело LT8 распознает человеческий антиген CD8 (димер с дисульфидной связью, экспрессируемый в виде двух гомодимеров альфа-цепи CD8 или гетеродимеров альфа/бета-цепи CD8). Специфичность антитела была подтверждена семинарами HLDA (семинар HLDA V(13) и семинар HLDA VII [7]).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Антитело MEM-28 распознает все изоформы лейкоцитов человеческого CD45 (рецептор протеинтирозинфосфатазы типа C). Специфичность антитела была подтверждена семинаром HLDA (семинар HLDA III [9]).

Точность

Точность метода определялась путем сравнения прибора KOMBITEST T Cell 4-color с аналогичными продуктами, доступными на рынке, или с другими хорошо документированными методами путем параллельного окрашивания 44 здоровых доноров и 104 пациентов с подозрением на патологию иммунной системы. Параметры линейного регрессионного анализа представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Линейный регрессионный анализ субпопуляций лимфоцитов здоровых доноров (сравнение прибора KOMBITEST T Cell 4-color с продуктом IVD BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 (Кат. № 342417))

Подвид лимфоцитов	Единица	n	Склон	Перехват	R^2	Диапазон
CD3+	%	44	1.00	-0.005	0.97	49.80-84.67
	кл/мкл	44	0.99	9.320	0.99	620-2187
CD3+CD8+	%	44	1.02	0.004	0.98	10.37 - 45.57
	кл/мкл	44	1.01	-3.216	1.00	151 - 1048
CD3+CD4+	%	44	1.04	-0.018	0.97	26.43 - 60.30
	кл/мкл	44	0.99	-1.259	0.98	337 - 1633

n = количество образцов крови

Таблица 4. Линейный регрессионный анализ подгрупп лимфоцитов у пациентов с подозрением на патологические состояния иммунной системы (сравнение прибора KOMBITEST T Cell 4-color с системой проточной цитометрии AQUIOS CL – Beckman Coulter. Inc. и собственным методом аккредитованной клинической лаборатории – а коктейль одноцветных конъюгированных антител от разных производителей и анализ на BD FACSCanto™ II)

Подвид лимфоцитов	Единица	n	Склон	Перехват	R^2	Диапазон
CD3+	%	104	1.040	-2.593	0.98	23.0 - 93.5
	кл/мкл	104	1.040	-0.067	0.96	362 - 5161
CD3+CD8+	%	104	1.045	-1.355	0.99	9.0 - 80.7
	кл/мкл	104	1.094	-1.355	0.95	152 - 3732
CD3+CD4+	%	104	0.985	0.029	0.99	1.4 - 67.0
	кл/мкл	104	0.980	-0.004	0.99	8 - 2818

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Линейность

Линейность метода была проверена на 10 серийных разведениях образца крови, обогащенного лейкоцитами (лейкоцитарная пленка). Образцы клеток окрашивали KOMBITEST T Cell 4-color в шести повторностях. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Результаты измерений для указанных подгрупп лимфоцитов оказались линейными в диапазоне лимфоцитов 40–10546 клеток/мкл с использованием BD FACSCanto™ II и 15–10519 клеток/мкл с использованием Beckman Coulter DxFLEX. Подмножества клеток находились в диапазонах, указанных в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Линейные диапазоны субпопуляций лимфоцитов, анализируемых с помощью BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	
Подвид лимфоцитов	Диапазон (кл/мкл)
CD3+	31 - 7302
CD3+CD8+	9 - 2182
CD3+CD4+	17 - 4080

Таблица 6. Линейные диапазоны субпопуляций лимфоцитов, проанализированные с помощью Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX	
Подвид лимфоцитов	Диапазон (кл/мкл)
CD3+	10 - 7268
CD3+CD8+	3 - 2297
CD3+CD4+	6 - 3940

Повторяемость

Повторяемость анализа измеряли на десяти образцах крови в шести повторностях. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Коэффициенты вариации (CV) представлены в таблицах ниже (Таблицы 7 и 8).

Таблица 7. Повторяемость устройства на BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Подвид лимфоцитов	**Единица**	**n**	**Среднее**	**SD**	**%CV**
CD3+	%	10	69.27	0.34	0.51
	кл/мкл	10	1408	7.30	0.51
CD3+CD8+	%	10	22.40	0.23	1.16
	кл/мкл	10	449	4.70	1.16
CD3+CD4+	%	10	42.21	0.28	0.68
	кл/мкл	10	864	6.04	0.68

Таблица 8. Повторяемость устройства на Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX					
Подвид лимфоцитов	**Единица**	**n**	**Среднее**	**SD**	**%CV**
CD3+	%	10	68.26	0.43	0.67
	кл/мкл	10	1389	10.12	0.67
CD3+CD8+	%	10	22.61	0.23	1.15
	кл/мкл	10	454	4.62	1.15
CD3+CD4+	%	10	41.04	0.45	1.09
	кл/мкл	10	842	10.09	1.09

Воспроизводимость

Воспроизводимость анализа измерялась на двух стабилизированных образцах крови (CD-Chex Plus® и CD-Chex Plus® CD4 Low) в одинаковых условиях в течение 15 дней с использованием 3 партий

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Прибора (по 5 дней каждая). Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Коэффициенты вариации (CV) приведены в таблицах ниже (табл. 9 и 10).

Таблица 9. Воспроизводимость устройства на BD FACSCanto™ II

Подвид лимфоцитов	Материал	Единица	Среднее	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76.60	0.35	0.45
		кл/мкл	1888	8.55	0.45
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60.07	0.40	0.67
		кл/мкл	872	5.82	0.67
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23.68	0.24	1.03
		кл/мкл	584	5.99	1.03
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42.19	0.28	0.67
		кл/мкл	612	4.09	0.67
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	48.99	0.37	0.75
		кл/мкл	1209	9.05	0.75
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12.77	0.26	2.03
		кл/мкл	185	3.76	2.03

Таблица 10. Воспроизводимость устройства на Beckman Coulter DxFLEX

Подвид лимфоцитов	Материал	Единица	Среднее	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76.60	0.35	0.45
		кл/мкл	1888	8.55	0.45
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60.07	0.40	0.67
		кл/мкл	872	5.82	0.67
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23.68	0.24	1.03
		кл/мкл	584	5.99	1.03
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42.19	0.28	0.67
		кл/мкл	612	4.09	0.67
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	48.99	0.37	0.75
		кл/мкл	1209	9.05	0.75
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12.77	0.26	2.03
		кл/мкл	185	3.76	2.03

12. Клинические характеристики

Пациенты с приобретенным иммунодефицитом

Клинические данные были собраны в клинической базе о 53 пациентах с подтвержденной инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Клинические характеристики устройства определялись путем сравнения использования устройства KOMBITEST T Cell 4-color с раствором для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Cat. No. ED7066) с собственным методом аккредитованной клинической лаборатории (коктейль из одноцветные конъюгированные антитела от разных производителей и анализ на BD FACSCanto™ II).

Результаты оценки иммунного статуса пациентов оценивали на наличие иммунодефицита (табл. 11).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 11. Клинические характеристики аппарата KOMBITEST T Cell 4-color – пациенты с ВИЧ

		Иммунный статус оценивается собственным методом аккредитованной клинической лаборатории.	
		Иммунная недостаточность	Нормальное состояние
Иммунный статус по данным прибора E D7734 KOMBITEST T Cell 4-цветный	Иммунная недостаточность	28 из 29 пациентов*	0 пациентов
	Нормальное состояние	0 пациентов	24 пациента

*Устройство ED7734 KOMBITEST T Cell 4-color не смогло окрасить антиген CD3 на Т-лимфоцитах у одного (1) пациента с ВИЧ в критическом состоянии.

13. Ожидаемые значения

Контрольный интервал

Референтные интервалы для устройства KOMBITEST T Cell 4-color были определены у группы пациентов с использованием раствора для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Кат. № ED7066) и проточного цитометра BD FACSLyric™. Субъектами были здоровые взрослые люди (доноры крови).

Таблица 12 Репрезентативные референтные интервалы для KOMBITEST T Cell 4-цветный

Подвид лимфоцитов	Единица	n	Значение	95% Диапазон
CD3+	%	44	70.08	52.47 – 87.69
	кл/мкл	44	1366	616 – 2117
CD3+CD8+	%	44	23.34	7.38 – 39.30
	кл/мкл	44	464	18 - 910
CD3+CD4+	%	44	42.57	23.55 – 61.58
	кл/мкл	44	820	333 – 1306

ВНИМАНИЕ: Значения, указанные при использовании устройства, являются лишь репрезентативными. Каждая лаборатория должна установить свои собственные референтные интервалы для местной популяции нормальных доноров.

14. Мешающие вещества и ограничения

Устройство KOMBITEST T Cell 4-color не было одобрено для использования в образцах, собранных с антикоагулянтами гепарин или цитрат-декстроза (ACD) при определении относительных и абсолютных показателей.

Прибор KOMBITEST T Cell 4-color не предназначен для скрининга и/или фенотипирования образцов лейкемии и лимфомы.

Абсолютные значения несопоставимы между лабораториями, использующими различное оборудование разных производителей.

15. Ссылки

1) Бенсусан. А и др. Значительное увеличение специфической субпопуляции CD3+CD8+ лейкоцитов периферической крови, опосредующих цитотоксическую активность Т-лимфоцитов во время заражения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

вирусом иммунодефицита человека. Proc Natl Acad Sci USA. 1993 15;90(20):9427-30. дои: 10.1073/pnas.90.20.9427.
2) Болдт. А и др. Восьмицветное иммунофенотипирование Т-. Б-. и субпопуляции NK-клеток для характеристики хронических иммунодефицитов. Цитометрия B Clin Cytom, май 2014 г.;86(3):191-206. doi:10.1002/cyto.b.21162.
3) де Сен-Базиль. Г и др. Тяжелый комбинированный иммунодефицит, вызванный дефицитом дельта- или эпсилон-субъединицы CD3. Джей Клин Инвест. Ноябрь 2004 г.;114(10):1512-7. дои: 10.1172/JCI22588.
4) Георгий. J V. Характеристика изменений субпопуляции Т-лимфоцитов с помощью проточной цитометрии при ВИЧ-заболевании. Энн, Нью-Йорк, Академия наук. 20 марта 1993 г.;677:417-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38803.x.
5) Иватани. Ю и др. Снижение количества Т-клеток, отрицательных по рецептору альфа-бета-Т-клеток, и клеток CD8. и увеличение CD4+ CD8+ клеток при активной болезни Хашимото и подостром тиреоидите. Клин Эксп Иммунол. Март 1992 г.;87(3):444-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb03017.x.
6) Ли. Ю и др. Профилактика и борьба со СПИДом в регионе Юньнань путем оценки субпопуляции Т-клеток. ПЛОС Один. 18 апреля 2019 г.;14(4):e0214800. doi: 10.1371/journal.pone.0214800
7) Мейсон. Д и др. ред.: Типирование лейкоцитов VII: Антигены дифференцировки лейкоцитов: материалы седьмого международного семинара и конференции, состоявшихся в Харрогейте. Соединенное Королевство: Издательство Оксфордского университета; 2002.
8) Маккарти. Б и др. Низкий уровень периферических Т-фолликулярных хелперных клеток у перинатально ВИЧ-инфицированных детей коррелирует с прогрессированием ВИЧ-инфекции. Фронт Иммунол. 24 августа 2018 г.;9:1901. дои: 10.3389/fimmu.2018.01901.
9) МакМайкл Эй Джей. ред. Типирование лейкоцитов III: 54 антигена дифференцировки лейкоцитов. Нью-Йорк. Нью-Йорк: Издательство Оксфордского университета; 1987.
10) Монафо. WJ и др. Наследственный иммунодефицит, характеризующийся дефицитом CD8+Т-лимфоцитов и нарушением активации лимфоцитов. Клин Эксп Иммунол. Декабрь 1992 г.;90(3):390-3. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05856.x.
11) Север. МЭ и др. Первичный дефект CD8+ лимфоцитов при болезни дефицита антител (общий вариабельный иммунодефицит): нарушения внутриклеточной продукции гамма-интерферона (ИФН-гамма) в CD28+ («цитотоксических») и CD28- («супрессорных») CD8+ подгруппах. Клин Эксп Иммунол. Январь 1998 г.; 111(1):70-5. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00479.x.
12) Пикат. М.К. и др. Активация Т-клеток позволяет различать подклассы симптоматических заболеваний первичного гуморального иммунодефицита у взрослых. БМК Иммунол. 2014, 12 марта; 15:13. дои: 10.1186/1471-2172-15-13.
13) Шлоссман С.Ф. Бумселл Л. Гилкс В. и др. ред.: Типирование лейкоцитов V: Антигены дифференцировки лейкоцитов. Нью-Йорк. Нью-Йорк: Издательство Оксфордского университета; 1995.
14) ван Донген. Дж. Дж. М. и др. Проточно-цитометрический диагностический скрининг и классификация первичных иммунодефицитов лимфоидной системы на основе EuroFlow. Фронт Иммунол. 2019, 13 июня; 10: 1271. дои: 10.3389/fimmu.2019.01271.

16. Товарные знаки

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ и FlowJo™ — зарегистрированные торговые марки Becton, Dickinson and Company, CD-Chex Plus® — зарегистрированная торговая марка Streck, Sysmex™ — зарегистрированная торговая марка Sysmex Corporation, VenturiOne® — зарегистрированная торговая марка. торговая марка Applied Cytometry, Infinicyt™ является зарегистрированной торговой маркой Cytognos S.L..

17. История изменений

Версия 1, ED7734_IFU_v1
Начальная версия

18. Производитель

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

25250 Vestec
Czech Republic

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

19. Уполномоченные представители

Ответственное лицо в Великобритании

Сисмекс ЮК Лтд.

Сисмекс Хаус
Гарамонд Драйв
Уимбуш
Милтон Кейнс
МК8 8ДФ
Великобритания
+44 (0)333 3203460
info@sysmex.co.uk

ВНИМАНИЕ: О любом серьезном происшествии, произошедшем с устройством, необходимо сообщать производителю и местному компетентному органу.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

KOMBITEST TBNK 6-цветный
50 тестов | Кат.Ном. **ED7733**

IVD CE

Инструкция по эксплуатации:
Версия ED7733_IFU_v1_EN
Дата издания: 13-12-2022

Символы

IVD	Медицинское устройство для диагностики in vitro		Температурный режим
CE	Маркировка соответствия CE		Беречь от солнечного света
	Производитель	UK CA	Знак UKCA
UDI	Уникальный идентификатор устройства		
	Ознакомьтесь с инструкцией по использованию		
Σ	Содержит достаточно для <n> тестов		
REF	Номер по каталогу		
LOT	Код партии		
	Использовать до		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Назначение

KOMBITEST TBNK 6-цветный предназначен для выявления и подсчета популяций и субпопуляций лимфоцитов в цельной крови человека методом проточной цитометрии.

Что обнаруживается и/или измеряется

Прибор KOMBITEST TBNK 6-цветный обнаруживает и измеряет относительное процентное и абсолютное количество Т-клеток человека (CD3+), В-клеток (CD3-CD19+), NK-клеток (CD3CD16+56+), хелперов/индукторов (CD3+CD4+) и супрессоров. /цитотоксические (CD3+CD8+) субпопуляции Т-клеток.

Функция устройства

Устройство предназначено для использования при иммунологической оценке здоровых пациентов и может помочь в диагностике пациентов, имеющих или подозреваемых в наличии иммунодефицита.

Контекст физиологического или патологического состояния

На частоту популяций лимфоцитов, измеряемую устройством, могут влиять различные патологические состояния, а оценка их процентного содержания и количества может использоваться при оценке:

• прогрессирование инфекции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [1,4,7,9]
• наследственные иммунодефициты [2,3,4,11,12,15,17]
• аутоиммунные заболевания [5,6]
• дефекты врожденной иммунной защиты [13,14]

Тип анализа

Не автоматизировано
Количественный

Тип требуемого образца

Образец периферической цельной крови человека с антикоагулянтами.

Тестируемая популяция

Не предназначен для конкретной группы населения.

2. Предполагаемый пользователь

Устройство предназначено только для профессионального лабораторного использования. Не для тестирования у пациента или самотестирования.

Требования к квалификации

Предполагаемый пользователь должен обладать новейшими знаниями в области анализа клеток человека методом проточной цитометрии, стандартными лабораторными методами, включая навыки пипетирования, безопасного и надлежащего обращения с образцами, полученными из человеческого тела. Предполагаемый пользователь должен соответствовать стандарту EN ISO 15189 или другим национальным стандартам, где это применимо.

3. Принцип тестирования

Принцип теста основан на обнаружении связывания моноклональных антител со специфической молекулой (антигеном), экспрессируемой определенными клетками крови человека. Моноклональные антитела, используемые в тесте, помечены различными флуорохромами, которые возбуждаются лазерным лучом проточного цитометра во время получения образца крови, окрашенного антителами. Последующая флуоресценция (излучение света) каждого флуорохрома, присутствующего на полученной клетке крови, собирается и анализируется прибором. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна плотности экспрессии антигена в клетке, что позволяет разделять различные подмножества клеток.

4. Реагент(ы) в комплекте

Содержимое

Прибор KOMBITEST TBNK 6-цветный рассчитан на 50 тестов и комплектуется следующим реагентом: 1 флакон (1 мл), содержащий предварительно смешанную комбинацию меченных флуорохромом моноклональных антител CD3 FITC/CD16 PE + CD56 PE/CD45 PerCP-Cy™. 5.5 / CD4 PE-Cy™7 / CD19

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

APC / CD8 APC-Cy™7, разведенные в оптимальных концентрациях в стабилизирующем фосфатно-солевом растворе (PBS), содержащем 15 мМ азида натрия.

Состав

Таблица 1 Описание активных компонентов

Антиген	Флюорохром	Клон	Изотип	Концентрация (мкг/мл)
CD3	FITC	TB3	IgG2b	2
CD4	PE-Cy™7	MEM-241	IgG1	1.5
CD8	APC-Cy™7	LT8	IgG1	1.8
CD16	PE	3G8	IgG1	1.5
CD56	PE	LT56	IgG2a	1.5
CD19	APC	LT19	IgG1	2
CD45	PerCP-Cy™5.5	MEM-28	IgG1	3

5. Материалы (не входят в комплект)

Пробироки с круглым дном диаметром 12x75 мм

Раствор для лизирования эритроцитов (EXCELLYSE Easy, EXBIO Praha, a.s., кат. номер ED7066 или CyLyse™ FX, Sysmex Partec GmbH, кат. номер BD303500)

Деионизированная вода (х.ч.)

Клетки для контроля процесса (Streck CD-Chex Plus®, кат. № 213323 или эквивалентный контроль лизируемых клеток)

6. Необходимое оборудование

Автоматическая пипетка с одноразовыми наконечниками (20–100 мкл) для дозирования образцов и реагентов.

Дозатор жидкости или пипетка с одноразовыми наконечниками (0,5–2 мл) для дозирования раствора, лизирующего эритроциты.

Вихревой смеситель

Гематологический анализатор (для абсолютного количества клеток), позволяющий определять количество лейкоцитов (лейкоцитов) и лимфоцитов на мкл образца

Проточный цитометр с двумя источниками лазерного возбуждения (488 нм и ~635 нм), детекторами рассеянного света, оптическими фильтрами и детекторами эмиссии, подходящими для сбора сигналов от флуорохромов, представлен в таблице 2.

Таблица 2 Спектральная характеристика флуорохромов, используемых в приборе

Флюорохром	Возбуждение [нм]	Излучение [нм]
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP-Cy™5.5	488	695
PE-Cy™7	488	780
APC	630-640	660
APC-Cy™7	630-640	780

ВНИМАНИЕ. Устройство было протестировано на проточных цитометрах BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) и Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Хранение и обращение.

Хранить при температуре 2–25 °C.

Избегайте длительного воздействия света.

Не замораживать.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

См. раздел 10 «Процедура (приготовление реагентов)» для получения информации о стабильности при использовании и сроке хранения после первого открытия, а также об условиях хранения и стабильности рабочих растворов (если применимо).

8. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования

Классификация опасностей СГС

Обратитесь к паспорту безопасности (SDS), доступному на странице продукта на сайте www.exbio.cz, для получения полной информации о рисках, связанных с химическими веществами и смесями, содержащимися в продукте, а также о том, как с ними следует обращаться и утилизировать.

Биологическая опасность

Биологические образцы человека, образцы крови и любые материалы, вступающие с ними в контакт, всегда считаются инфекционными материалами. Используйте средства индивидуальной защиты и обеспечения безопасности, чтобы избежать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. Соблюдайте все применимые законы, правила и процедуры по обращению и утилизации инфекционных материалов.

Свидетельства ухудшения

Обычно поставляемый реагент выглядит как прозрачная жидкость. Не используйте реагент, если вы заметили какие-либо изменения во внешнем виде, например, помутнение или признаки выпадения осадка.

Ограничение использования

Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке продукта.

9. Образец

Используйте венозную периферическую кровь, собранную в сосуд для образцов, классифицированный как медицинское изделие, с антикоагулянтом ЭДТА.

> **ПРИМЕЧАНИЕ.** Определите абсолютное количество лейкоцитов и количество лимфоцитов в собранном образце крови с помощью гематологического анализатора. Прибор KOMBITEST TBNK 6-цветный сам по себе не обеспечивает подсчет абсолютного количества клеток.

Образец крови с количеством лейкоцитов, превышающим 40x103 клеток/мкл, перед обработкой образца необходимо разбавить PBS.

Обрабатывайте образец крови не позднее, чем через 24 часа после сбора.

10. Процедура

Приготовление предоставленного реагента(ов)

Никакой подготовки реагента не требуется.

Перед использованием доведите реагент до комнатной температуры. Держите основной контейнер устройства сухим.

Используйте реагент непосредственно из оригинального первичного контейнера. Время использования реагента (под воздействием света и повышенной температуры) не должно превышать 4 часов в сутки. После первого вскрытия реагент сохраняет свои эксплуатационные характеристики до истечения срока годности при хранении в заявленных условиях в оригинальной первичной упаковке.

> **ВНИМАНИЕ:** Не разбавляйте реагент.

Подготовка необходимых, но не предоставляемых материалов

Разбавьте концентрированный раствор для лизирования эритроцитов деионизированной водой в соответствии с инструкциями производителя. Разведенный (1X) раствор для лизирования эритроцитов стабилен в течение 1 месяца при хранении в дозаторе для жидкости или закрытом контейнере при комнатной температуре.

Контроль качества

Используйте Streck CD-Chex Plus® или эквивалентные контрольные ячейки в качестве положительного процедурного контроля, чтобы гарантировать правильную работу устройства по назначению. Streck CD-Chex Plus® обеспечивает установленные значения процентного положительного и абсолютного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

количества Т-клеток, В-клеток, гранулоцитов, моноцитов и NK-клеток, включая два клинически значимых уровня CD4+ клеток.
Окрасьте контрольные клетки реагентом КОМБИТЕСТ ТБНК 6 цветов в соответствии с обработкой проб, указанной в инструкции по эксплуатации. Убедитесь, что полученные результаты (% положительных клеток) находятся в пределах ожидаемого диапазона, указанного для использованной партии контрольных клеток.

Окрашивание образцов

1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Нанесите пипеткой 20 мкл реагента KOMBITEST TBNK 6-цветный на дно пробирки размером 12 x 75 мм.
3. Нанесите пипеткой 50 мкл хорошо перемешанного образца крови на дно пробирки.

   ВНИМАНИЕ: Не допускайте попадания крови на стенку пробирки. Если мазок или капля крови останется на стенке пробирки, возможно, они не окрашены реагентом или эритроциты не лизируются, и результат теста может оказаться недействительным.
4. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.
5. Добавьте в пробирку 500 мкл разбавленного (1X) лизирующего раствора.
6. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте.

Немедленно соберите окрашенный образец на проточном цитометре. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, храните его при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 24 часов.

ВНИМАНИЕ: Встряхивайте окрашенный образец непосредственно перед сбором на проточном цитометре, чтобы избежать образования агрегатов.

Анализ проточной цитометрии

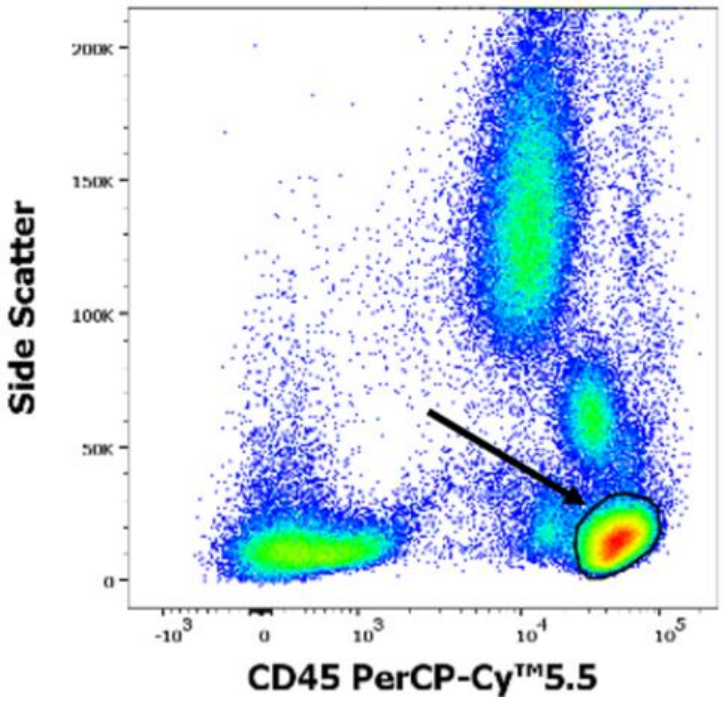
Проточный цитометр, выбранный для использования с прибором KOMBITEST TBNK 6-цветный, необходимо в плановом порядке калибровать с использованием флуоресцентных микрошариков для обеспечения стабильной чувствительности детекторов в соответствии с инструкциями производителя цитометра.
При неправильном обслуживании проточный цитометр может давать ложные результаты. См. технические характеристики цитометров производителя лазеров и детекторов флуоресценции в соответствии с характеристиками возбуждения и излучения флуорохромов в разделе 6 «Необходимое оборудование».
Установите напряжение на интересующих детекторах флуоресценции перед анализом окрашенных образцов. Напряжение на детекторе ФЭУ должно быть установлено достаточно высоким, чтобы минимум событий отрицательного окрашивания мешал 0-му каналу на оси флуоресценции. Также напряжение детектора ФЭУ не должно превышать значений, при которых положительные события смещаются к правой оси.
Компенсируйте сигналы флуоресценции между детекторами до или после сбора данных. Данные могут быть неправильно интерпретированы, если сигналы флуоресценции компенсируются неправильно или ворота расположены неточно.
Для анализа измеренных данных можно использовать программное обеспечение цитометра, разработанное производителем, или программное обеспечение, предназначенное для автономного анализа данных цитометрии (например, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Анализ данных препарата КОМБИТЕСТ ТБНК, окрашенного в 6 цветов

Визуализируйте компенсированные данные на графике бокового рассеяния (SSC) в зависимости от CD45 PerCP-Cy™5.5. Установите ворота для популяции CD45+ лимфоцитов, как показано на рисунке 1.

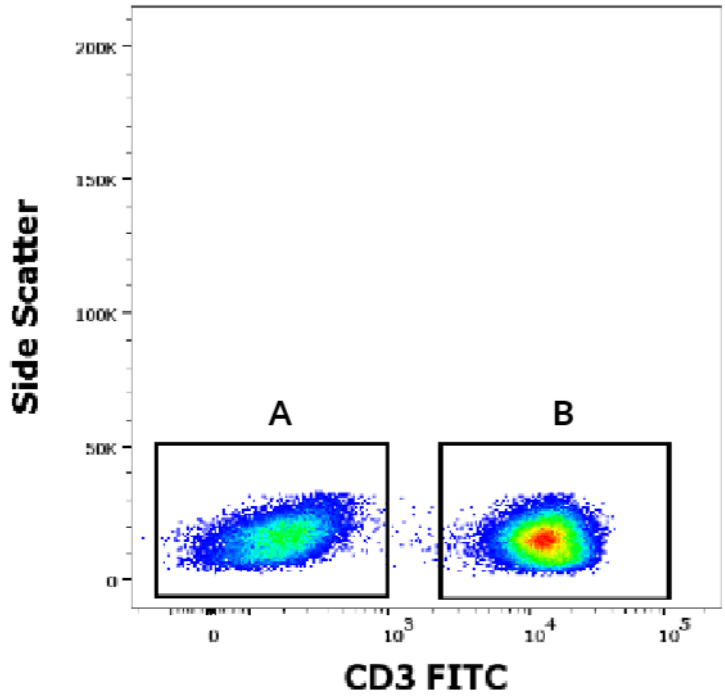
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Разграничение популяции CD45+ лимфоцитов.



Постройте закрытые лимфоциты CD45+ на графике бокового рассеяния (SSC) и CD3 FITC, как показано на рисунке 2. Отдельные CD3+ и CD3- лимфоциты, используя соответствующие ворота. Рассчитайте процент Т-клеток (CD3+; область B на рисунке 2) от всех лимфоцитов.

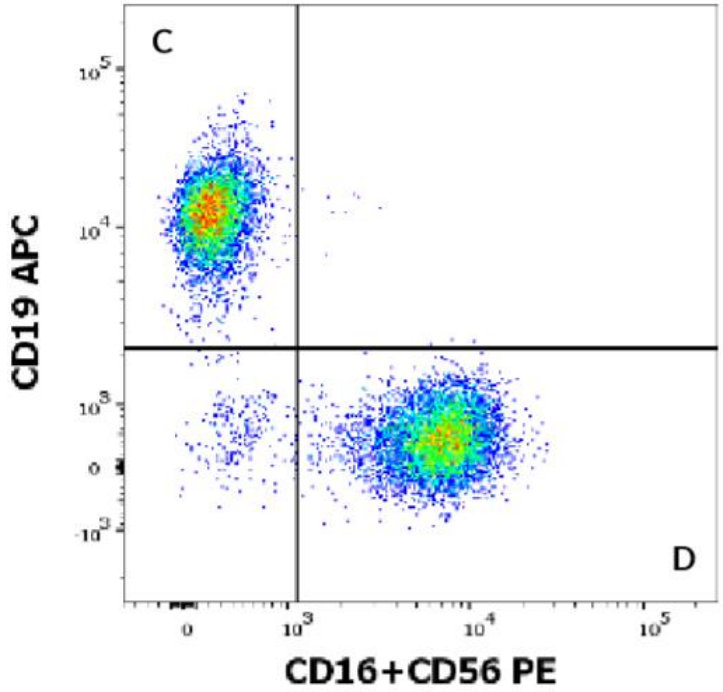
Рисунок 2. Разделение CD3+ и CD3- лимфоцитов.



Нанесите на график закрытые CD3-лимфоциты (область A на рисунке 2) как CD19 APC в сравнении с CD16+CD56 PE, как показано на рисунке 3. Установите соответствующие ворота и рассчитайте процент B-клеток (CD16-CD56-CD19+; область C на рисунке). 3) и естественные клетки-киллеры (NK) (CD16+CD56+CD19-; область D на рисунке 3) из всех лимфоцитов.

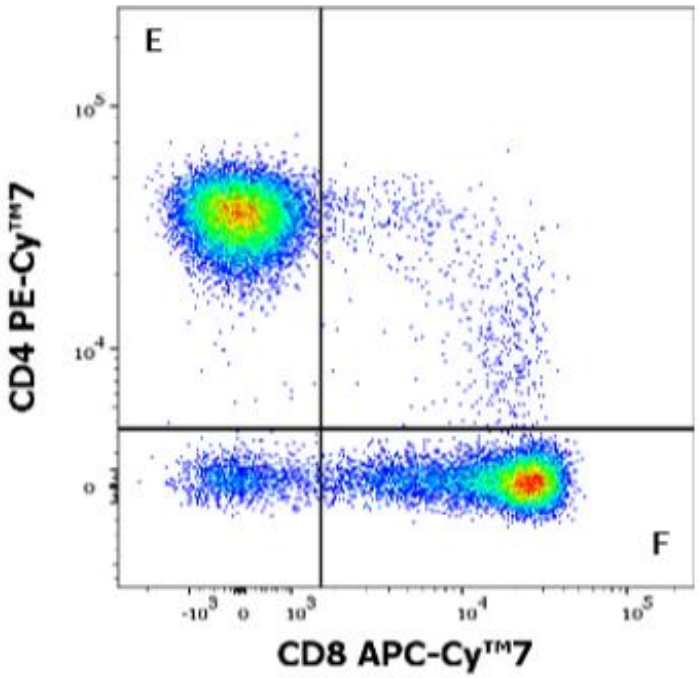
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 3. CD3-лимфоциты на точечной диаграмме CD19 APC в сравнении с CD16+CD56 PE.



Нанесите на график закрытые Т-клетки (CD3+; область B на рисунке 2) как CD4 PE-Cy™7 в сравнении с CD8 APC-Cy™7, как показано на рисунке 4. Установите соответствующие ворота и рассчитайте процент Т-хелперов/индукторов (CD4 +CD8-; область E на рисунке 4) и супрессорные/цитотоксические Т-клетки (CD4-CD8+; область F на рисунке 4) из всех лимфоцитов.

Рисунок 4. CD3+ лимфоциты на точечной диаграмме CD4 PE-Cy™7 в сравнении с CD8 APC-Cy™7.



Расчет и интерпретация аналитических результатов

Чтобы получить абсолютные значения, используйте абсолютное количество лимфоцитов, определенное гематологическим анализатором. См. инструкции производителя гематологического анализатора. Используйте приведенные ниже уравнения для абсолютного подсчета необходимого подмножества лимфоцитов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

$$A \times \frac{B\ (\%)}{100\ (\%)} = \textbf{абсолютное количество необходимой субпопуляции лимфоцитов}$$

A = абсолютное количество лимфоцитов (данные гематологического анализатора; клеток/мкл)
B = относительные проценты необходимой субпопуляции лимфоцитов от всех лимфоцитов (данные проточного цитометра; %)

11. Аналитическая деятельность

ВНИМАНИЕ: Все аналитические данные были измерены с использованием раствора для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., кат. номер ED7066).

Специфика

Антитело TB3 распознает человеческий антиген CD3 комплекса TCR/CD3. Специфичность антитела была подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA X и HLDA XI).
Антитело MEM-241 распознает человеческий антиген CD4 (гликопротеин CD4 поверхности Т-клеток). Специфичность антитела подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA VIII).
Антитело LT8 распознает человеческий антиген CD8 (димер с дисульфидной связью, экспрессируемый в виде двух гомодимеров альфа-цепи CD8 или гетеродимеров альфа/бета-цепи CD8). Специфичность антитела была подтверждена семинарами HLDA (семинар HLDA V(16) и семинар HLDA VII [8]).
Антитело 3G8 распознает человеческий антиген CD16 (низкоаффинный Fc-гамма-рецептор иммуноглобулина III типа). Специфичность антитела была подтверждена семинаром HLDA (семинар HLDA V [16]).
Антитело LT56 распознает лейкоцитарную изоформу человеческого антигена CD56 (молекула адгезии нервных клеток 1). Специфичность антитела подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA X).
Антитело LT19 распознает человеческий антиген CD19 (трансмембранный гликопротеин В-клеток CD19). Специфичность антитела подтверждена Советом HCDM (семинар HLDA X).
Антитело MEM-28 распознает все изоформы лейкоцитов человеческого CD45 (рецептор протеинтирозинфосфатазы типа С). Специфичность антитела была подтверждена семинаром HLDA (семинар HLDA III [10]).

Точность

Точность метода определялась путем сравнения аппарата KOMBITEST TBNK 6-цветный с аналогичными препаратами, доступными на рынке, или с другими хорошо документированными методами путем параллельного окрашивания 30 здоровых доноров и 134 пациентов с подозрением на патологию иммунной системы. Параметры линейного регрессионного анализа представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Линейный регрессионный анализ субпопуляций лимфоцитов у здоровых доноров (сравнение прибора KOMBITEST TBNK 6-цветный с продуктом IVD BD Multitest™ 6-Color TBNK Reagent (Кат. № 644611))

Подвид лимфоцитов	Ед.	n	Наклон	Перехват	R2	Диапазон
CD3+	%	30	1.00	-0.006	0.99	49.03 - 84.87
	кл/мкл	30	0.99	5.464	1.00	608 - 2137
CD3+CD8+	%	30	0.98	0.003	1.00	10.43 - 40.17
	кл/мкл	30	0.97	8.959	1.00	145 – 1016
CD3+CD4+	%	30	0.99	0.004	0.99	29.70 – 56.37
	кл/мкл	30	0.99	6.588	1.00	321 – 1407
CD3-CD16+CD56+	%	30	1.01	-0.002	1.00	5.15 – 38.93
	кл/мкл	30	1.02	-6.186	1.00	97 – 1036
CD3-CD19+	%	30	1.00	0.003	0.99	5.42 – 25.00
	кл/мкл	30	1.02	1.611	0.99	74 - 352

n = количество образцов крови

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4. Линейный регрессионный анализ субпопуляций лимфоцитов у пациентов с подозрением на патологические состояния иммунной системы (сравнение прибора KOMBITEST TBNK 6-color с системой проточной цитометрии AQUIOS CL – Beckman Coulter, Inc. и собственным методом аккредитованной клинической лаборатории – коктейль одноцветных конъюгированных антител от разных производителей и анализ на BD FACSCanto™ II)

Подвид лимфоцитов	Ед.	n	Наклон	Перехват	R2	Диапазон
CD3+	%	134	1.032	-2.655	0.98	23.9 – 94.5
	кл/мкл	134	1.023	-0.047	0.97	140 – 5178
CD3+CD8+	%	134	1.020	-0.803	0.98	9.1 – 80.7
	кл/мкл	134	1.055	-0.041	0.96	60 – 3546
CD3+CD4+	%	134	1.014	-0.651	0.98	1.4 – 67.5
	кл/мкл	134	0.994	-0.005	0.98	8 – 2826
CD3-CD16+CD56+	%	134	1.064	-0.400	0.98	1.6 – 68.2
	кл/мкл	134	1.080	-0.014	0.99	10 – 2612
CD3-CD19+	%	134	1.027	-0.376	0.99	0.0 – 69.7
	кл/мкл	134	1.043	-0.010	1.00	0 – 4586

Линейность

Линейность метода была проверена на 10 серийных разведениях образца крови, обогащенного лейкоцитами (лейкоцитарная пленка). Образцы клеток окрашивали KOMBITEST TBNK 6-цветный в шести повторностях. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Данные измерений для указанных подгрупп лимфоцитов оказались линейными в диапазоне лимфоцитов 333–9492 клеток/мкл при использовании BD FACSCanto™ II и 309–8693 клеток/мкл при использовании Beckman Coulter DxFLEX. Подмножества клеток находились в диапазонах, указанных в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Линейные диапазоны субпопуляций лимфоцитов, анализируемых с помощью BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	
Подвид лейкоцитов	Диапазон (кл/мкл)
CD3+	249 – 6594
CD3+CD8+	96 – 2560
CD3+CD4+	136 – 3628
CD3-CD16+CD56+	55 – 1525
CD3-CD19+	44 – 1342

Таблица 6. Линейные диапазоны субпопуляций лимфоцитов, проанализированные с помощью Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX	
Подвид лейкоцитов	Диапазон (кл/мкл)
CD3+	243 – 6565
CD3+CD8+	102 – 2652
CD3+CD4+	128 – 3517
CD3-CD16+CD56+	64 – 1588
CD3-CD19+	41 – 1280

Повторяемость

Повторяемость анализа измеряли на десяти образцах крови в шести повторностях. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Коэффициенты вариации (CV) представлены в таблицах ниже (Таблицы 7 и 8).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 7. Повторяемость устройства на BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Подвид лимфоцитов	**Ед.**	**n**	**Среднее**	**SD**	**%CV**
CD3+	%	10	70.34	0.56	0.91
	кл/мкл	10	1396	10.22	0.91
CD3+CD8+	%	10	23.11	0.27	1.25
	кл/мкл	10	453	5.23	1.25
CD3+CD4+	%	10	41.06	0.53	1.36
	кл/мкл	10	808	9.71	1.36
CD3-CD16+CD56+	%	10	16.32	0.40	2.43
	кл/мкл	10	289	7.20	2.43
CD3-CD19+	%	10	11.63	0.25	2.31
	кл/мкл	10	227	4.78	2.31

Таблица 8. Повторяемость устройства на Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter DxFLEX					
Подвид лимфоцитов	**Ед.**	**n**	**Среднее**	**SD**	**%CV**
CD3+	%	10	70.80	0.61	0.95
	кл/мкл	10	1406	11.19	0.95
CD3+CD8+	%	10	23.80	0.32	1.42
	кл/мкл	10	468	6.12	1.42
CD3+CD4+	%	10	40.81	0.56	1.47
	кл/мкл	10	803	10.52	1.47
CD3-CD16+CD56+	%	10	15.89	0.40	2.72
	кл/мкл	10	282	7.23	2.72
CD3-CD19+	%	10	11.68	0.32	2.83
	кл/мкл	10	227	5.94	2.83

Воспроизводимость

Воспроизводимость анализа измерялась на двух стабилизированных образцах крови (CD-Chex Plus® и CD-Chex Plus® CD4 Low) в одинаковых условиях в течение 15 дней с использованием 3 партий Прибора (по 5 дней каждая). Образцы анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto™ II и проточного цитометра Beckman Coulter DxFLEX. Коэффициенты вариации (CV) приведены в таблицах ниже (табл. 9 и 10).

Таблица 9. Воспроизводимость устройства на BD FACSCanto™ II

Подвид лимфоцитов	**Материал**	**Ед.**	**Среднее**	**SD**	**%CV**
CD3+	CD-Chex Plus®	%	76.84	0.18	0.23
		кл/мкл	1896	4.39	0.23
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60.61	0.32	0.53
		кл/мкл	879	4.65	0.53
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23.45	0.23	0.97
		кл/мкл	578	5.62	0.97
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42.17	0.31	0.73
		кл/мкл	612	4.55	0.73
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	48.78	0.45	0.93
		кл/мкл	1203	11.15	0.93
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12.53	0.26	2.11
		кл/мкл	182	3.84	2.11
CD3-CD16+CD56+	CD-Chex Plus®	%	10.76	0.22	2.03
		кл/мкл	265	5.39	2.03
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.51	0.38	1.94
		кл/мкл	283	5.49	1.94
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11.30	0.16	1.45
		кл/мкл	279	4.03	1.45
	CD-Chex Plus®	%	18.05	0.32	1.75

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	CD4 Low	кл/мкл	262	4.58	1.75

Таблица 10. Воспроизводимость устройства на Beckman Coulter DxFLEX

Подвид лимфоцитов	Материал	Ед.	Среднее	SD	%CV
CD3+	CD-Chex Plus®	%	77.17	0.21	0.27
		кл/мкл	1904	5.23	0.27
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	60.85	0.43	0.71
		кл/мкл	883	6.24	0.71
CD3+CD8+	CD-Chex Plus®	%	23.87	0.20	0.85
		кл/мкл	589	4.99	0.85
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	42.81	0.32	0.75
		кл/мкл	621	4.65	0.75
CD3+CD4+	CD-Chex Plus®	%	46.47	1.41	3.03
		кл/мкл	1146	34.77	3.03
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	12.16	0.53	4.37
		кл/мкл	176	7.71	4.37
CD3-CD16+CD56+	CD-Chex Plus®	%	10.59	0.20	1.88
		кл/мкл	261	4.92	1.88
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	19.38	0.32	1.63
		кл/мкл	281	4.59	1.63
CD3-CD19+	CD-Chex Plus®	%	11.07	0.17	1.54
		кл/мкл	273	4.19	1.54
	CD-Chex Plus® CD4 Low	%	17.85	0.35	1.95
		кл/мкл	259	5.05	1.95

12. Клинические характеристики

Пациенты с первичным иммунодефицитом

Клинические данные были собраны в клинической базе у 30 пациентов с подозрением на общий вариабельный иммунодефицит (ОВИН). Клинические характеристики устройства ED7733 определялись путем сравнения использования устройства KOMBITEST TBNK 6-color с раствором для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Кат. № ED7066) с аккредитованным клиническим лабораторным методом (система проточной цитометрии AQUIOS CL - Бекман Коултер, Инк.). Результаты оценки иммунного статуса пациентов оценивали на наличие иммунодефицита (табл. 11).

Таблица 11. Клинические характеристики аппарата KOMBITEST TBNK 6-цветный – больные ОВИН

		Иммунный статус оценивается аккредитованным клиническим лабораторным методом.	
		Иммунная недостаточность	Нормальное состояние
Иммунный статус по данным прибора E D7733 КОМБИТЕСТ ТБН К 6-цветный	Иммунная недостаточность	24 пациента	0 пациентов
	Нормальное состояние	0 пациентов	6 пациентов

Пациенты с приобретенным иммунодефицитом

Клинические данные были собраны в клиническом центре о 53 пациентах с подтвержденной инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Клинические характеристики устройства определялись путем сравнения использования аппарата KOMBITEST TBNK 6-цветный с раствором для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Кат. № ED7066) с собственным методом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

аккредитованной клинической лаборатории (коктейль отдельных цветные конъюгированные антитела разных производителей и анализ на BD FACSCanto™ II).
Результаты оценки иммунного статуса пациентов оценивали на предмет иммунодефицита (табл. 12).

Таблица 12. Клинические характеристики аппарата KOMBITEST TBNK 6-цветный – ВИЧ-пациенты

		Иммунный статус оценивается аккредитованным клиническим лабораторным методом.	
		Иммунная недостаточность	Нормальное состояние
Иммунный статус по данным прибора ED7733 КОМБИТЕСТ ТБН К 6-цветный	Иммунная недостаточность	28 из 29 пациентов	0 пациентов
	Нормальное состояние	0 пациентов	24 пациента

*Прибор ED7733 KOMBITEST TBNK 6-color не смог окрасить антиген CD3 на Т-лимфоцитах у одного (1) пациента с ВИЧ в критическом состоянии.

13. Ожидаемые значения

Эталонный интервал

Референтные интервалы для устройства KOMBITEST TBNK 6-color были определены у группы пациентов с использованием раствора для лизиса эритроцитов EXCELLYSE Easy (EXBIO Praha, a.s., Кат. № ED7066) и проточного цитометра BD FACSCanto™ II. Субъектами были здоровые взрослые люди (доноры крови).

Таблица 13 Репрезентативные референтные интервалы для KOMBITEST TBNK 6-цветныйный

Подвид лимфоцитов	Ед.	n	Значение	95% Диапазон
CD3+	%	30	69.49	50.81-88.17
	кл/мкл	30	1308	573-2043
CD3+CD8+	%	30	22.68	9.29-36.07
	кл/мкл	30	431	53-810
CD3+CD4+	%	30	42.70	27.72-57.67
	кл/мкл	30	802	352-1252
CD3-CD16+CD56+	%	30	18.70	0.60-35.53
	кл/мкл	30	351	0-822
CD3-CD19+	%	30	11.62	2.65-20.59
	кл/мкл	30	211	72-351

ВНИМАНИЕ: Значения, указанные при использовании устройства, являются лишь репрезентативными. Каждая лаборатория должна установить свои собственные референтные интервалы для местной популяции нормальных доноров.

14. Мешающие вещества и ограничения

Прибор KOMBITEST TBNK 6-цветный не был одобрен для использования в образцах, собранных с антикоагулянтами гепарин или цитрат-декстроза (АКД) при определении относительных и абсолютных показателей.
Прибор KOMBITEST TBNK 6-цветный не предназначен для скрининга и/или фенотипирования образцов лейкозов и лимфом.
Абсолютные значения несопоставимы между лабораториями, использующими различное оборудование разных производителей.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15. Ссылки

1) Бенсуссан А. и др. Значительное увеличение специфической субпопуляции CD3+CD8+ лейкоцитов периферической крови, опосредующих цитотоксическую активность Т-лимфоцитов во время заражения вирусом иммунодефицита человека. Proc Natl Acad Sci USA. 1993 15;90(20):9427-30. дои: 10.1073/pnas.90.20.9427.
2) Болдт А. и др. Восьмицветное иммунофенотипирование субпопуляций Т-, В- и NK-клеток для характеристики хронических иммунодефицитов. Цитометрия B Clin Cytom, май 2014 г.;86(3):191-206. doi:10.1002/cyto.b.21162.
3) де Сен-Базиль, G и др. Тяжелый комбинированный иммунодефицит, вызванный дефицитом дельта- или эпсилон-субъединицы CD3. Джей Клин Инвест. Ноябрь 2004 г.;114(10):1512-7. дои: 10.1172/JCI22588.
4) Джорджи, Дж. В. Характеристика изменений субпопуляции Т-лимфоцитов с помощью проточной цитометрии при ВИЧ-заболевании. Энн, Нью-Йорк, Академия наук. 20 марта 1993 г.;677:417-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38803.x.
5) Иватани Ю. и др. Снижение количества Т-клеток, отрицательных по рецептору альфа-бета-Т-клеток, и клеток CD8, а также увеличение количества CD4+ CD8+ клеток при активной болезни Хашимото и подостром тиреоидите. Клин Эксп Иммунол. Март 1992 г.;87(3):444-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb03017.x.
6) Кучуксезер, Ю.С. и др. Роль естественных клеток-киллеров в аутоиммунных заболеваниях. Фронт Иммунол. 2021, 25 февраля; 12: 622306. дои: 10.3389/fimmu.2021.622306.
7) Ли, Ю и др. Профилактика и борьба со СПИДом в регионе Юньнань путем оценки субпопуляции Т-клеток. ПЛОС Один. 18 апреля 2019 г.;14(4):e0214800. doi: 10.1371/journal.pone.0214800.
8) Мейсон, Д. и др., ред.: Типирование лейкоцитов VII: Антигены дифференцировки лейкоцитов: Материалы седьмого международного семинара и конференции, состоявшихся в Харрогейте, Соединенное Королевство: Издательство Оксфордского университета; 2002.
9) Маккарти Б. и др. Низкий уровень периферических Т-фолликулярных хелперных клеток у перинатально ВИЧ-инфицированных детей коррелирует с прогрессированием ВИЧ-инфекции. Фронт Иммунол. 24 августа 2018 г.;9:1901. дои: 10.3389/fimmu.2018.01901.
10) МакМайкл А.Дж., изд. Типирование лейкоцитов III: 54 антигена дифференцировки лейкоцитов. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк: Издательство Оксфордского университета; 1987.
11) Монафо, WJ и др. Наследственный иммунодефицит, характеризующийся дефицитом CD8+ Т-лимфоцитов и нарушением активации лимфоцитов. Клин Эксп Иммунол. Декабрь 1992 г.;90(3):390-3. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05856.x.
12) Норт, М.Е. и др. Первичный дефект CD8+ лимфоцитов при болезни дефицита антител (общий вариабельный иммунодефицит): нарушения внутриклеточной продукции гамма-интерферона (ИФН-гамма) в CD28+ («цитотоксических») и CD28- («супрессорных») CD8+ подгруппах. Клин Эксп Иммунол. Январь 1998 г.; 111(1):70-5. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00479.x.
13) Оранж, Дж. С. Дефицит естественных клеток-киллеров. J Аллергия Клин Иммунол. Сентябрь 2013 г.; 132(3): 515–525. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.020.
14) Оранж, Дж. С. Как я справляюсь с дефицитом естественных клеток-киллеров. Дж Клин Иммунол. Январь 2020 г.;40(1):13–23. дои: 10.1007/s10875-019-00711-7.
15) Пикат, М.К. и др. Активация Т-клеток позволяет различать подклассы симптоматических заболеваний первичного гуморального иммунодефицита у взрослых. БМК Иммунол. 2014, 12 марта; 15:13. дои: 10.1186/1471-2172-15-13.
16) Шлоссман С.Ф., Бумселл Л., Гилкс В. и др., ред.: Типирование лейкоцитов V: Антигены дифференцировки лейкоцитов. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк: Издательство Оксфордского университета; 1995.
17) ван Донген, Дж. Дж. М. и др. Проточно-цитометрический диагностический скрининг и классификация первичных иммунодефицитов лимфоидной системы на основе EuroFlow. Фронт Иммунол. 2019, 13 июня; 10: 1271. дои: 10.3389/fimmu.2019.01271.

16. Товарные знаки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ и FlowJo™ — зарегистрированные торговые марки Becton, Dickinson and Company, CD-Chex Plus® — зарегистрированная торговая марка Streck, Cy™ — зарегистрированная торговая марка Cytiva, Sysmex™ — зарегистрированная торговая марка корпорации Sysmex, VenturiOne® является зарегистрированной торговой маркой Applied Cytometry, Infinicyt™ является зарегистрированной торговой маркой Cytognos S.L.

17. История изменений

Версия 1, ED7733_IFU_v1
Начальная версия

18. Производитель

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

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

19. Уполномоченные представители

Ответственное лицо в Великобритании

Сисмекс ЮК Лтд.

Сисмекс Хаус
Гарамонд Драйв
Уимбуш
Милтон Кейнс
МК8 8ДФ
Великобритания
+44 (0)333 3203460
info@sysmex.co.uk

ВНИМАНИЕ: О любом серьезном происшествии, произошедшем с устройством, необходимо сообщать производителю и местному компетентному органу.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CD34 QuantiFlowEx Kit
50 тестов | Кат.Ном. **ED7080**

IVD CE

Инструкция по эксплуатации:
Версия ED7080_IFU_v3_EN
Дата издания: 09-12-2022

Символы

IVD	Медицинское устройство для диагностики in vitro		Беречь от солнечного света
CE	Маркировка соответствия CE		Осторожность
	Производитель	CONC 10×	Концентрированный раствор (10x)
UDI	Уникальный идентификатор устройства	CONTENTS	Состав
	Ознакомьтесь с инструкцией по использованию	UK CA	Знак UKCA
REF	Номер по каталогу		
LOT	Код партии		
	Использовать до		
	Температура хранения		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Назначение

Набор CD34 QuantiFlowEx предназначен для обнаружения и подсчета общего количества жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток из общего количества жизнеспособных лейкоцитов в образцах крови и тканей человека методом проточной цитометрии.

Что обнаруживается и/или измеряется

Устройство CD34 QuantiFlowEx Kit обнаруживает и измеряет относительное процентное и абсолютное количество гемопоэтических стволовых клеток человека (CD34+CD45dim).

Функция устройства

Прибор предназначен для контроля количества гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови, костном мозге, пуповинной крови и продукте лейкафереза.

Контекст физиологического или патологического состояния

Точный подсчет количества гемопиетических стволовых клеток (ГСК) в образцах крови и тканей человека или трансплантатах для трансплантации необходим для ведения пациентов или обработки трансплантатов (1).

Тип анализа

Не автоматизировано

Количественный

Требуемый тип образца

Нормальная периферическая кровь, или мобилизованная периферическая кровь, или продукт(ы) лейкафереза, или костный мозг, или пуповинная кровь.

Тестируемая популяция

Не предназначен для конкретной группы населения.

2. Предполагаемый пользователь

Устройство предназначено только для профессионального лабораторного использования. Не для тестирования у пациента или самотестирования.

Требования к квалификации

Предполагаемый пользователь должен обладать новейшими знаниями в области анализа клеток человека методом проточной цитометрии, стандартными лабораторными методами, включая навыки пипетирования, безопасного и надлежащего обращения с образцами, полученными из человеческого тела.

Предполагаемый пользователь должен соответствовать стандарту EN ISO 15189 или другим национальным стандартам, где это применимо.

3. Принцип тестирования

Принцип теста основан на обнаружении связывания моноклональных антител со специфической молекулой (антигеном), экспрессируемой определенными клетками крови человека. Моноклональные антитела, используемые в тесте, помечены различными флуорохромами, которые возбуждаются лазерным лучом проточного цитометра во время получения образца крови, окрашенного антителами. Последующая флуоресценция (излучение света) каждого флуорохрома, присутствующего на полученной клетке крови, собирается и анализируется прибором. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна плотности экспрессии антигена в клетке, что позволяет разделять различные подмножества клеток.

7-AAD представляет собой краситель, непроницаемый для клеточных мембран, который выводится из жизнеспособных клеток и связывается с ДНК в нежизнеспособных клетках. Различия в интенсивности флуоресценции клеток позволяют исключить нежизнеспособные клетки из анализа.

4. Реагент(ы) предоставлен(ы)

Содержание

Прибора CD34 QuantiFlowEx Kit достаточно для проведения 50 тестов и он поставляется со следующими реагентами:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагент для окрашивания (ED7080-1; 1 флакон), содержащий 1 мл предварительно смешанной комбинации меченных флуорохромом моноклональных антител CD45 FITC и CD34 PE, разведенных в оптимальных концентрациях в стабилизирующем фосфатно-солевом растворе (PBS), содержащем 15 мМ азида натрия, см. Таблицу 1. .
7-AAD (ED7080-2; 1 флакон), содержащий 1 мл красителя жизнеспособности клеток 7-аминоактиномицин D (7-AAD), разведенного в оптимальной концентрации в стабилизирующем фосфатно-солевом растворе (PBS), содержащем 15 мМ азида натрия.
Лизирующий раствор (ED7080-3; 1 флакон), содержащий 15 мл концентрированного (10-кратного) забуференного раствора на основе хлорида аммония, не содержащего фиксаторов.

Состав

Таблица 1 Описание и концентрации активных компонентов

Антиген	Флюорохром	Клон	Изотип	Концентрация (мкг/мл)
CD45	FITC	MEM-28	IgG1	30
CD34	PE	4H11 [APG]	IgG1	35

5. Необходимые, но не предоставленные материалы.

Пробирки с круглым дном 12 x 75 мм.
Деионизированная вода (х.ч.)
Клетки контроля процесса (Streck CD-Chex CD34®, контроль CD34 – 3 уровня, кат. № 213337, 213347, 213383 или эквивалентный контроль лизируемых клеток с предварительно заданным количеством HSC CD34)
Для метода одной платформы (необязательно):
Пробирки BD Trucount™ (5 мл), содержащие флуоресцентный стандарт для подсчета клеток, для использования с цитометрами Becton Dickinson
Флуоросферы Beckman Coulter Flow-Count™ — стандарт подсчета флуоресцентных клеток для цитометров Beckman Coulter

6. Необходимое оборудование

Автоматическая пипетка с одноразовыми наконечниками (20–100 мкл) для дозирования образцов и реагентов.
Дозатор жидкости или пипетка с одноразовыми наконечниками (2 мл) для дозирования раствора, лизирующего эритроциты.
Вихревой смеситель
Гематологический анализатор (для абсолютного количества клеток), позволяющий определять количество лейкоцитов (лейкоцитов) и лимфоцитов на мкл образца
Проточный цитометр с одним источником лазерного возбуждения (488 нм), детекторами рассеянного света, оптическими фильтрами и эмиссионными детекторами, подходящими для сбора сигналов от флуорохромов, представлены в таблице 2.

Таблица 2 Спектральная характеристика флуорохромов, используемых в приборе

Флюорохром	Возбуждение [нм]	Излучение [нм]
FITC	488	525
PE	488	576
7-AAD	488	670

ВНИМАНИЕ: Устройство было протестировано на проточных цитометрах BD FACSCanto™ (BD Biosciences) и Navios (Beckman Coulter).

7. Хранение и обращение.

Хранить при температуре 2–8 °C.
Избегайте длительного воздействия света.
Не замораживать.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

См. раздел 10 «Процедура (приготовление реагентов)» для получения информации о стабильности при использовании и сроке хранения после первого открытия, а также об условиях хранения и стабильности рабочих растворов (если применимо).

8. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования.

Классификация опасностей СГС

Обратитесь к паспорту безопасности (SDS), доступному на странице продукта на сайте www.exbio.cz, для получения полной информации о рисках, связанных с химическими веществами и смесями, содержащимися в продукте, а также о том, как с ними следует обращаться и утилизировать.

Биологическая опасность

Биологические образцы человека, образцы крови и любые материалы, вступающие с ними в контакт, всегда считаются инфекционными материалами.

Используйте средства индивидуальной защиты и обеспечения безопасности, чтобы избежать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

Соблюдайте все применимые законы, правила и процедуры по обращению и утилизации инфекционных материалов.

Свидетельства ухудшения

Обычно поставляемые реагенты выглядят как прозрачная жидкость. Не используйте реагент, если вы заметили какие-либо изменения во внешнем виде, например, помутнение или признаки выпадения осадка.

Ограничение использования

Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке продукта.

9. Образец

Используйте материал крови или тканей, собранный в контейнер для образцов, классифицированный как медицинское устройство, с антикоагулянтом ЭДТА, гепарином или ACD (кислотный цитрат-декстроза).

С помощью устройства можно проанализировать следующий образец:
нормальная и мобилизованная периферическая кровь, продукты лейкафереза, костный мозг и пуповинная кровь.

> **ВНИМАНИЕ:** Определите абсолютное количество лейкоцитов в собранном образце с помощью гематологического анализатора. Устройство CD34 QuantiFlowEx Kit само по себе не обеспечивает подсчет абсолютного количества клеток.

Обрабатывайте образец не позднее, чем через 24 часа после сбора.

10. Процедура

Приготовление предоставленного реагента(ов)

Окрашивающий реагент и 7-ААД

Никакой подготовки реагента не требуется.

Перед использованием доведите реагент до комнатной температуры. Держите основной контейнер устройства сухим.

Используйте реагент непосредственно из оригинального первичного контейнера.

После первого вскрытия реагент сохраняет свои эксплуатационные характеристики до истечения срока годности при хранении в заявленных условиях в оригинальной первичной упаковке.

> **ВНИМАНИЕ:** Не разбавляйте реагент.

Лизирующий раствор

Разбавьте концентрированный (10X) лизирующий раствор эритроцитов до рабочего лизирующего раствора (1X) деионизированной водой.

> **ВНИМАНИЕ:** Рабочий лизирующий раствор (1X) стабилен только в течение 1 дня. Каждый день готовьте рабочий лизирующий раствор (1X), смешивая 1 часть концентрированного (10X) лизирующего раствора с 9 частями деионизированной воды и храните в дозаторе жидкости или закрытом контейнере при комнатной температуре.

Подготовка необходимых, но не предоставляемых материалов

Для приготовления и использования флуоресцентных стандартов количества клеток следуйте инструкциям производителя.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль качества

Используйте Streck CD-Chex CD34® или эквивалентные контрольные ячейки в качестве положительного процедурного контроля, чтобы гарантировать правильную работу устройства по назначению. Streck CD-Chex CD34® предоставляет установленные значения процентного положительного и абсолютного количества CD34+ HSC.

Окрасьте контрольные клетки с помощью набора CD34 QuantiFlowEx в соответствии с обработкой образца, как указано в инструкции по применению. Убедитесь, что полученные результаты (% положительных клеток) находятся в пределах ожидаемого диапазона, указанного для использованной партии контрольных клеток.

Окрашивание образцов – метод единой платформы

1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.

   ВНИМАНИЕ. Используйте пробирку BD Trucount™ в качестве пробирки для абсолютного подсчета стволовых клеток CD34, за исключением случаев, когда стандарт подсчета клеток Flow-Count™ FluorSpheres предназначен для использования на этапе 8.

2. Внесите пипеткой 20 мкл окрашивающего реагента на дно пробирки размером 12 x 75 мм.
3. Внесите пипеткой 20 мкл 7-AAD на дно пробирки размером 12 x 75 мм.
4. Нанесите пипеткой 100 мкл хорошо перемешанного образца на дно пробирки, используя технику обратного пипетирования.

   ВНИМАНИЕ: Точность пипетирования имеет решающее значение для подсчета абсолютного количества стволовых клеток CD34+. Поэтому следует использовать технику обратного пипетирования с использованием пипетки с автоматическим вытеснением воздухом.

   Для аспирации пробы при обратном пипетировании нажмите ручку пипетки до второго упора и аспирируйте пробу. Затем поместите наконечник пипетки с образцом крови рядом со дном пробирки и нажмите ручку пипетки до первого упора для дозирования пробы.

   Не допускайте попадания крови на стенку пробирки. Если мазок или капля крови останется на стенке пробирки, возможно, они не окрашены реагентом или эритроциты не лизируются, и результат теста может оказаться недействительным.

5. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 20–30 минут при комнатной температуре в темноте.
6. Добавьте в пробирку 2 мл рабочего лизирующего раствора (1X).
7. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте.
8. Если пробирка BD Trucount™ не использовалась в качестве пробирки, добавьте 100 мкл флуоросфер Flow-Count™, используя метод обратного пипетирования. Следуйте инструкциям производителя.
9. Сразу же возьмите окрашенный образец на проточном цитометре. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, закройте пробирку, храните при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 2 часов.

   ВНИМАНИЕ: Встряхивайте окрашенный образец непосредственно перед сбором на проточном цитометре, чтобы избежать образования агрегатов.

Окрашивание образцов – метод двойной платформы

   ВНИМАНИЕ: Определите абсолютное количество лейкоцитов в собранном образце с помощью гематологического анализатора перед обработкой образца.

1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Внесите пипеткой 20 мкл окрашивающего реагента на дно пробирки размером 12 x 75 мм.
3. Внесите пипеткой 20 мкл 7-AAD на дно пробирки размером 12 x 75 мм.
4. Нанесите пипеткой 100 мкл хорошо перемешанного образца на дно пробирки, используя технику обратного пипетирования.
5. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 20–30 минут при комнатной температуре в темноте.
6. Добавьте в пробирку 2 мл рабочего лизирующего раствора (1X).
7. Перемешайте и инкубируйте пробирку в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Сразу же возьмите окрашенный образец на проточном цитометре. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, закройте пробирку, храните при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 2 часов.

ВНИМАНИЕ: Встряхивайте окрашенный образец непосредственно перед сбором на проточном цитометре, чтобы избежать образования агрегатов.

Анализ проточной цитометрии

Проточный цитометр, выбранный для использования с устройством CD34 QuantiFlowEx Kit, необходимо регулярно калибровать с использованием флуоресцентных микрогранул для обеспечения стабильной чувствительности детекторов в соответствии с инструкциями производителя цитометра. При неправильном обслуживании проточный цитометр может давать ложные результаты.

См. технические характеристики цитометров производителя лазеров и детекторов флуоресценции в соответствии с характеристиками возбуждения и излучения флуорохромов в разделе 6 «Необходимое оборудование».

Установите напряжение на интересующих детекторах флуоресценции перед анализом окрашенных образцов. Напряжение на детекторе ФЭУ должно быть установлено достаточно высоким, чтобы минимум событий отрицательного окрашивания мешал 0-му каналу на оси флуоресценции. Также напряжение детектора ФЭУ не должно превышать значений, при которых положительные события смещаются к правой оси.

В зависимости от образца необходимо получить не менее 300 000–1 000 000 событий на пробирку.

Всегда регистрируйте параметры рассеяния света ячейки: рассеяние света под прямым углом (как площадь сигнала, так и высота сигнала) и боковое (перпендикулярное) рассеяние света (как площадь сигнала, так и высота сигнала).

Для метода **единой платформы** Установите порог флуоресценции в детекторе FITC, а не размер события для сбора данных. Порог прямого рассеяния (размер события) может исключить из анализа события микрочастиц стандарта подсчета, что отрицательно повлияет на подсчет процента стволовых клеток CD34+.

Для метода **двойной платформы** установите порог прямого рассеяния.

Компенсируйте сигналы флуоресценции между детекторами до или после сбора данных. Данные могут быть неправильно интерпретированы, если сигналы флуоресценции компенсируются неправильно или границы расположены неточно.

ВНИМАНИЕ: Для подготовки компенсационного контроля 7-AAD следует использовать образцы с ожидаемой низкой жизнеспособностью клеток. Образцы с высокой жизнеспособностью клеток обеспечивают низкое количество мертвых клеток. Низкое количество мертвых клеток может отрицательно влиять на среднюю интенсивность флуоресценции 7-AAD мертвых клеток и может привести к недостаточной компенсации.

Для анализа измеренных данных можно использовать программное обеспечение цитометра, разработанное производителем, или программное обеспечение, предназначенное для автономного анализа данных цитометрии (например, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Анализ данных образца, окрашенного набором CD34 QuantiFlowEx Kit

Анализируйте измеренные и компенсированные данные с помощью соответствующего программного обеспечения. Для подсчета процента живых стволовых клеток CD34+ следует применять протокол гейтирования Международного общества гематотерапии и трансплантологии (ISHAGE) (рис. 1-5).

Используя 5 параметров (2 параметра рассеяния света и 3 параметра флуоресценции) CD34+ гемопоэтические стволовые клетки идентифицируются с помощью комбинации последовательного и логического гейтирования в соответствии с их свойствами.

Истинные стволовые клетки CD34+ экспрессируют антигены CD34 и CD45, однако экспрессия CD45 аналогична экспрессии бластных клеток. Интенсивность окрашивания заметна, но ниже, чем, например, у лимфоциты.

Настоящие стволовые клетки CD34+ также обеспечивают сигнал рассеяния света под прямым углом, подобно бластным клеткам или лимфоцитам, и демонстрируют свойства низкого перпендикулярного рассеяния света (боковое рассеяние).

На рисунках 1-5 показана последовательность логических границ, обеспечивающая точную идентификацию живых стволовых клеток CD34+ для точного процентного подсчета.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Изображение слева представляет все стробируемые события из областей A, B, C, G (полученных из области F) и I. Сначала поместите границы вокруг живых клеток в области сигнала бокового рассеяния (SSCA) по сравнению с 7-AAD. Точечный график окрашивания жизнеспособности показан как область A на изображении справа. Примечание. При использовании стабилизированного контроля крови, например Streck CD-Chex CD34® настоятельно рекомендуется проверить жизнеспособность области A и при необходимости изменить ее положение, поскольку стабилизированная кровь содержит формальдегид, который проникает через клеточную мембрану, что приводит к положительному окрашиванию красителем жизнеспособности 7-AAD.

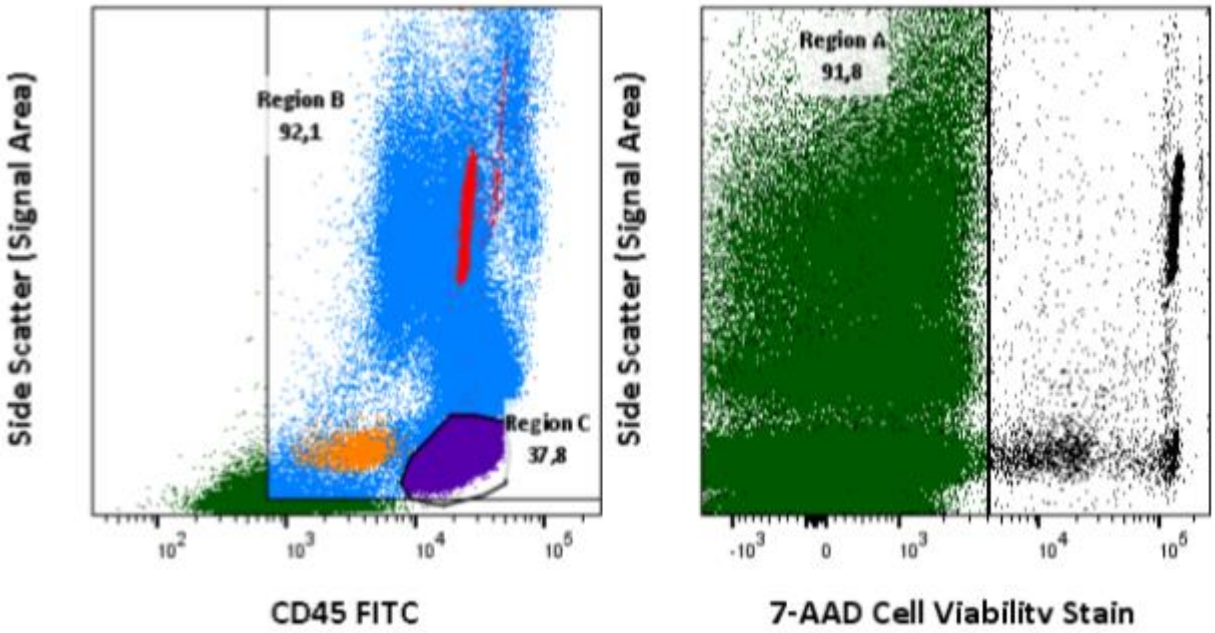


Рисунок 2. Визуализируйте клетки из области A на точечном графике SSC-A по сравнению с CD45 FITC и разместите границы вокруг лейкоцитов (область B) и границы вокруг лимфоцитов, представленных как область C. Перенесите клетки из области B в SSC-A по сравнению с областью C. Постройте точечный график CD34 PE и поместите границы вокруг положительных событий CD34 (область D). На изображении справа показаны события, происходящие от флуоресцентных микрочастиц из области I, изображенного в области E. Область E указывает на оптические и флуоресцентные свойства стандарта подсчета флуоресцентных микрочастиц, присутствующего в пробирке BD TruCount™.

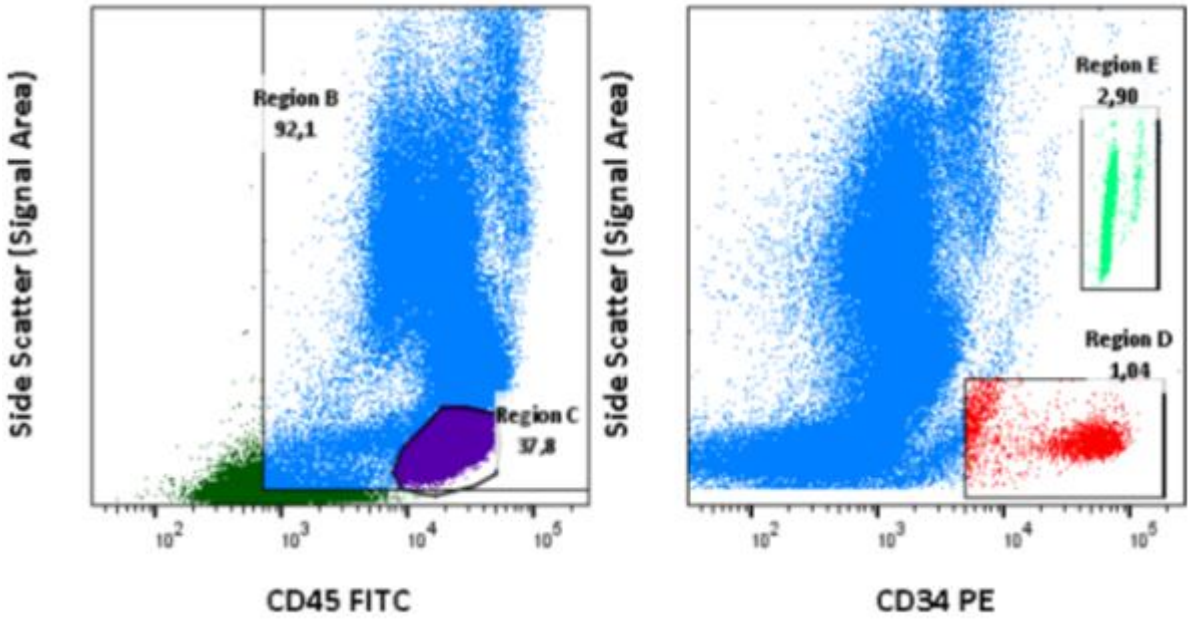


Рисунок 3. Визуализируйте область A в CD34 PE по сравнению с CD45 FITC и разместите области вокруг флуоресцентного стандарта для подсчета микрочастиц, разграничивая микрочастицы из BD TruCount™, полученные на цитометре BD FACSCanto™ (область I), и микрочастицы из Beckman

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Coulter's Flow-Count™, полученные на Beckman Coulter. Цитометр Navios™ (область J). Примечание 1. Размер шариков и свойства флуоресценции могут различаться у разных производителей. На рис. 3 представлены размеры и флуоресцентные свойства шариков, присутствующих в пробирке BD TruCount™ или во флуоросферах Beckman Coulter Flow-Count™.

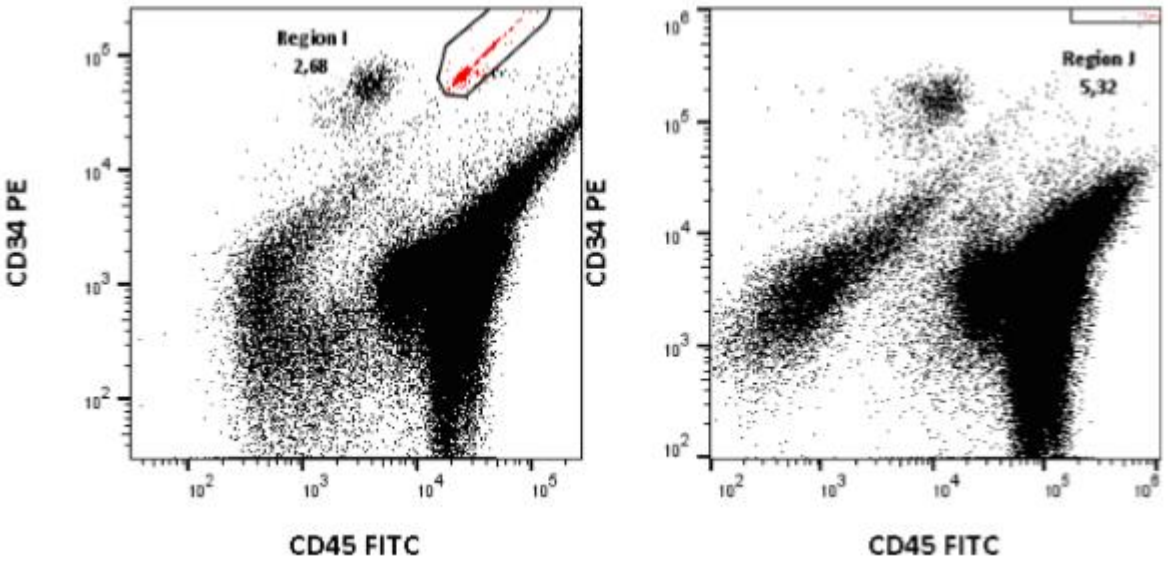


Рисунок 4. Очистите положительные события CD34 из области D, поместив область F вокруг тусклого кластера положительных по CD45 клеток на точечном графике SSC-A по сравнению с CD45 FITC с событиями из области D, как показано на изображении слева. Отобразите лейкоциты CD45 + (область C) на точечном графике SSC-A в зависимости от высоты сигнала прямого рассеяния (FSC-H). Поместите новые границы, очерчивающие лимфоциты (область G).

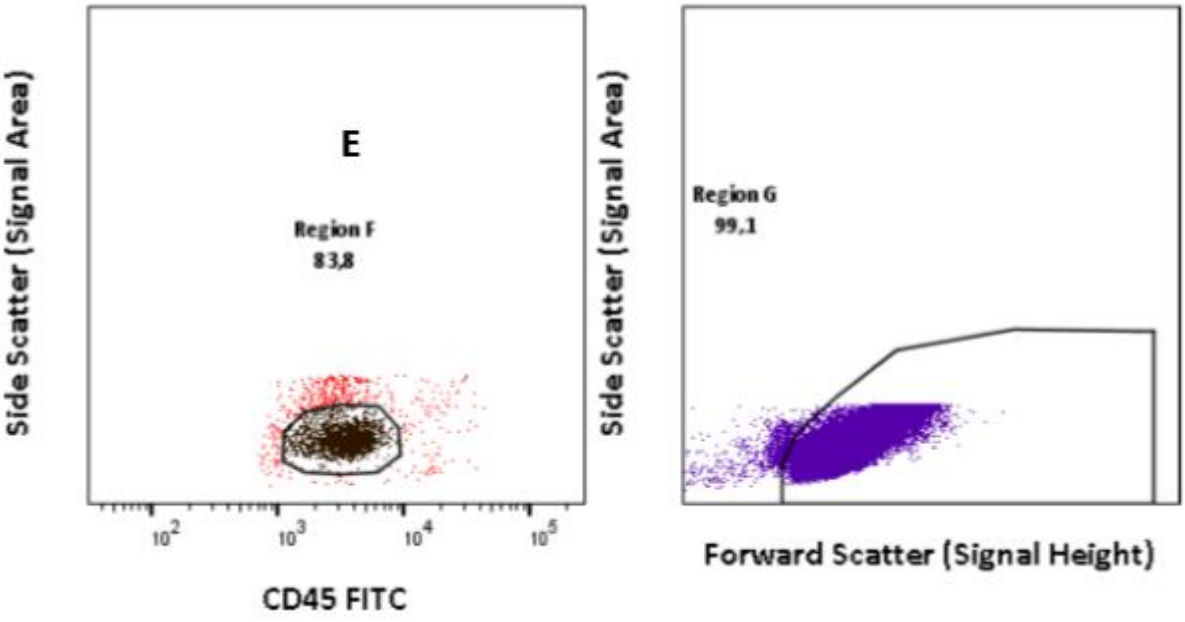


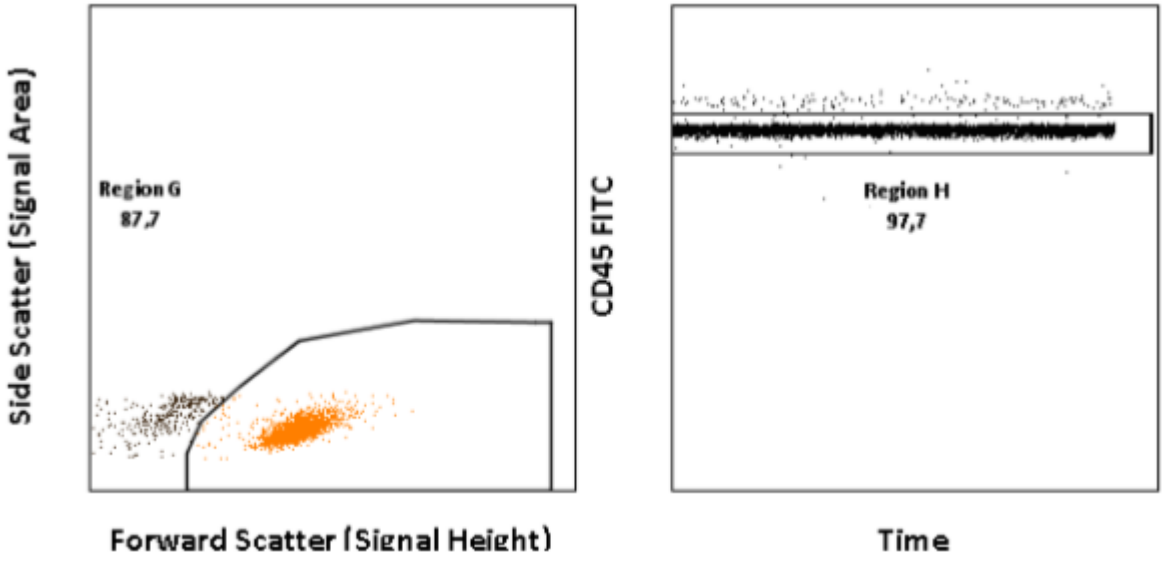
Рисунок 5. Визуализируйте клетки **области F** на точечном графике SSC-A и FSC-H и вставьте границы (**область G**) с **рис. 4** на этот точечный график, чтобы дифференцировать кластер стволовых клеток CD34+ от более мелких событий и обломки. Скопируйте границы **обаласти G**, разграничивающие лимфоциты, с событиями из области F, визуализируемыми на точечной диаграмме SSC-A и FSC-H, чтобы дифференцировать кластер стволовых клеток CD34 + от более мелких событий, таких как мусор. Клетки области F (рис. 4), обнаруженные внутри границ области G, представляют собой истинные стволовые клетки CD34+.

Все события, визуализированные на точечной диаграмме зависимости времени от CD45 FITC, позволяют разместить границы (**область H**) вокруг шариков для счета синглетов, как показано на рисунке справа.

Примечание 2. Любую неоднородность в области H (нарушение сбора данных, снижение флуоресценции) следует учитывать для проверки. Неоднородное получение событий или сбор данных,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

который не перпендикулярен оси CD45 FITC, указывает на проблемы с жидкостной системой проточного цитометра.



Расчет и интерпретация аналитических результатов – метод единой платформы

Используйте приведенные ниже уравнения для подсчета процентного и абсолютного количества живых стволовых клеток CD34+ из всех живых лейкоцитов.

Подсчет абсолютного количества живых CD34+ стволовых клеток на 1 мкл материала крови:

$$\boldsymbol{CD34^{+}\ Abs} = \frac{\text{Область } \boldsymbol{G}}{\text{Область } \boldsymbol{H}} \times \boldsymbol{PM} \times \boldsymbol{DF}$$

Подсчет абсолютного количества живых лейкоцитов в 1 мкл материала крови:

$$\boldsymbol{WBC\ Abs} = \frac{\text{Область } \boldsymbol{B}}{\text{Область } \boldsymbol{H}} \times \boldsymbol{PM} \times \boldsymbol{DF}$$

Подсчет процента живых CD34+ стволовых клеток из всех живых лейкоцитов:

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

CD34+ Abs	абсолютное количество живых CD34+ стволовых клеток в 1 мкл материала крови
WBC Abs	абсолютное количество живых лейкоцитов в 1 мкл материала крови
% CD34⁺	процент живых стволовых клеток CD34+ от всех живых лейкоцитов
Область B	количество событий в сегменте B (лейкоциты)
Область G	настоящие стволовые клетки CD34+
Область H	количество событий в области H (микрочастицы)
PM	количество микрочастиц на 1 мкл оцениваемого образца, указанное производителем микрочастиц
DF	коэффициент разведения (разведение образца перед окрашиванием); DF = 2 означает, что 1 часть материала крови (100 мкл) была разведена с использованием 1 части PBS, содержащего 0,5% БСА (100 мкл)

Расчет и интерпретация аналитических результатов – метод двойной платформы

Используйте гематологический анализатор для определения количества лейкоцитов в мкл образца. См. инструкции производителя гематологического анализатора.

Используйте приведенные ниже уравнения для подсчета процентного и абсолютного количества живых стволовых клеток CD34+ из всех живых лейкоцитов.

Подсчет абсолютного количества живых CD34+ стволовых клеток на 1 мкл материала крови:

$$\boldsymbol{CD34^{+}Abs} = \frac{\text{Область } \boldsymbol{G}}{\text{Область } \boldsymbol{B}} \times \boldsymbol{WBC\ Abs} \times \boldsymbol{DF}$$

Подсчет процента живых CD34+ стволовых клеток из всех живых лейкоцитов:

$$\%\ \boldsymbol{CD34^{+}} = \frac{\text{Область } \boldsymbol{G}}{\text{Область } \boldsymbol{B}} \times \boldsymbol{100}$$

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CD34+ Abs	абсолютное количество живых CD34+ стволовых клеток в 1 мкл материала крови
WBC Abs	абсолютное количество живых лейкоцитов в 1 мкл материала крови
% CD34+	процент живых стволовых клеток CD34+ от всех живых лейкоцитов
Область B	количество событий в сегменте B (лейкоциты)
Область G	настоящие стволовые клетки CD34+
DF	коэффициент разведения (разведение образца перед окрашиванием); DF = 2 означает, что 1 часть материала крови (100 мкл) была разведена с использованием 1 части PBS, содержащего 0,5% БСА (100 мкл)

11. Аналитическая деятельность

Специфика

Антитело MEM-28 распознает все изоформы лейкоцитов человеческого CD45 (рецептор протеинтирозинфосфатазы типа C). Специфичность антитела была подтверждена семинаром HLDA (семинар HLDA III [2]).

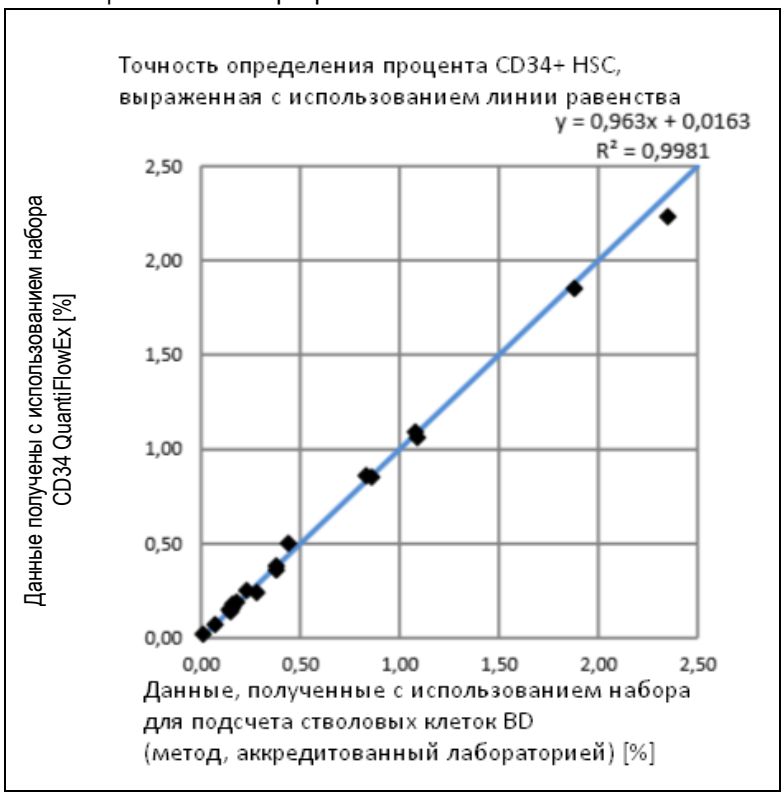
Антитело 4H11[APG] распознает эпитоп класса III человеческого антигена CD34 (мукозиалин). Специфичность антитела была подтверждена семинаром HLDA (семинар HLDA VI [3]).

Точность

Точность метода была установлена тремя различными экспериментами, проведенными на разных участках и на разном количестве экземпляров.

1. Корреляция между ожидаемыми результатами, полученными аккредитованным методом с использованием набора для подсчета стволовых клеток BD™ и набора CD34 QuantiFlowEx. Образцы различного происхождения (костный мозг, периферическая кровь и продукт афереза периферической крови) из гематологии и онкологии (n = 23) были собраны и проанализированы. используя как аккредитованный метод, так и набор CD34 QuantiFlowEx.

В качестве метода выбора для получения данных использовался **метод двойной платформы** с использованием гематологического анализатора и цитометра BD FACSCanto™ II. Результаты анализировали с помощью линейной регрессии.



2. Степень согласия между ожидаемыми результатами при использовании контроля CD34 и набора CD34 QuantiFlowEx.

Контрольный CD34 от Streck CD-Chex CD34® использовали для трех различных уровней CD34+ клеток, присутствующих в стабилизированном образце крови. Повторные анализы (n = 5) оценивали, попадают ли полученные результаты CD34 % в ожидаемый диапазон, указанный в технических характеристиках продукта Streck CD-Chex CD34®.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В качестве метода выбора для получения данных, представленных в Таблице 3, использовался **метод двойной платформы** с использованием гематологического анализатора и цитометра BD FACSCanto™.

Таблица 3. ТОЧНОСТЬ. Степень согласия между ожидаемыми результатами при использовании контроля CD34 и набора CD34 QuantiFlowEx.

CD-Chex реплицируется (n = 5)	Ожидаемый диапазон	Ожидаемое среднее значение [%]	Полученное среднее значение [%]	SD	CV [%]	95% значений Диапазон
Уровень 1	0.02-0.12	0.07	0.087	0.006	7.13	0.075-0.099
Уровень 2	0.41-0.63	0.52	0.544	0.023	4.23	0.498-0.590
Уровень 3	1.38-1.98	1.68	1.610	0.03	1.86	1.55-1.67

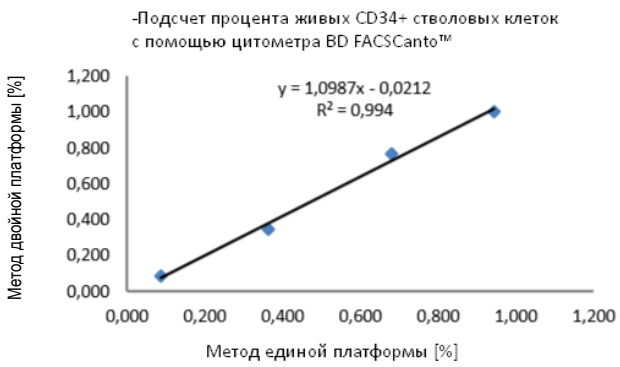
3. Степень согласия между 4 различными методами получения CD34+ и абсолютного количества CD45+ и CD34%.

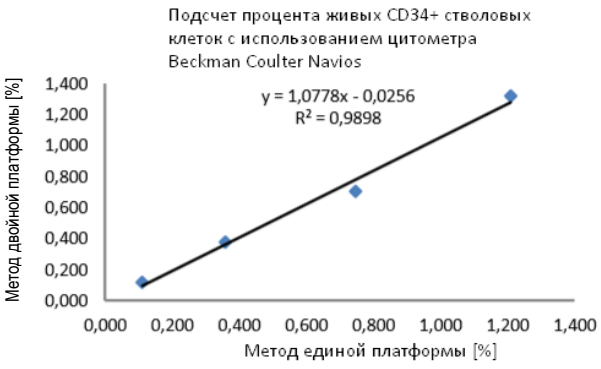
Набор CD34 QuantiFlowEx использовался для абсолютного подсчета CD34+ и подсчета % CD34 вместе с двумя другими коммерчески доступными продуктами, предназначенными для определения процентного содержания стволовых клеток CD34+ и подсчета абсолютного количества в сочетании с методом одной и двойной платформы.

4 различных образца пациентов были проанализированы в (n = 3) повторах на абсолютное количество CD34+ и подсчет % CD34 с использованием метода единой платформы на цитометре BD FACSCanto™ и цитометре Beckman Coulter Navios. Для абсолютного подсчета CD34+ и % CD34 с использованием метода двойной платформы использовали цитометры BD FACSCanto™ и Beckman Coulter Navios™ вместе с гематологическим анализатором Sysmex XN-1000™. Данные показаны в таблице ниже.

Таблица 4. Подсчет процентного содержания живых CD34+ стволовых клеток от всех живых лейкоцитов [%]

Цитометр BD FACSCanto™		Цитометр Beckman Coulter Navios	
Набор для подсчета стволовых клеток BD™ Анализ на одной платформе	CD34 QuantiFlowEx Kit, анализ на двух платформах	Анализ единой платформы с использованием Stem-kit	CD34 QuantiFlowEx Kit, анализ на двух платформах
0.088	0.086	0.111	0.117
0.680	0.765	0.747	0.703
0.944	1.000	1.210	1.320
0.363	0.345	0.359	0.375

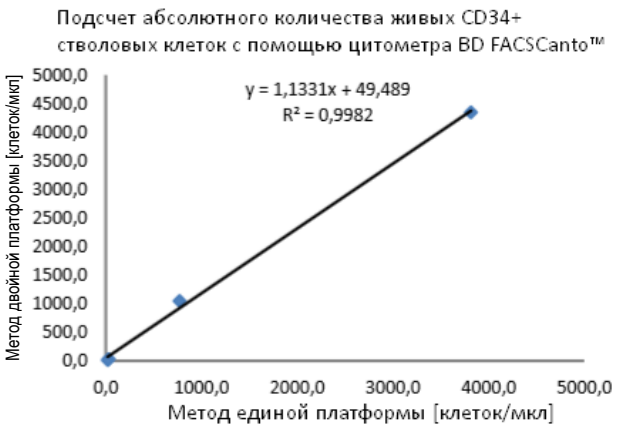


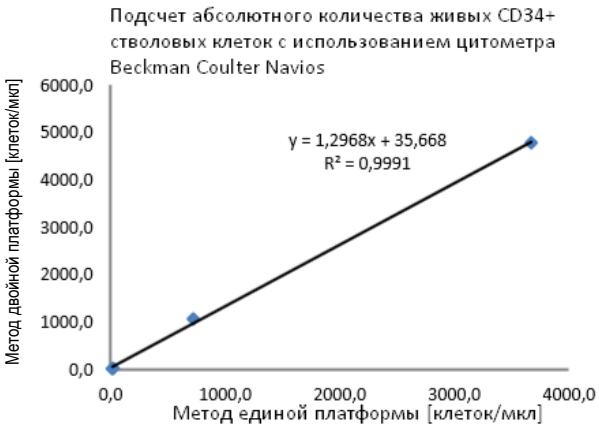


Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 5. Подсчет абсолютного количества живых стволовых клеток CD34+ для всех живых лейкоцитов [количество клеток/мкл]

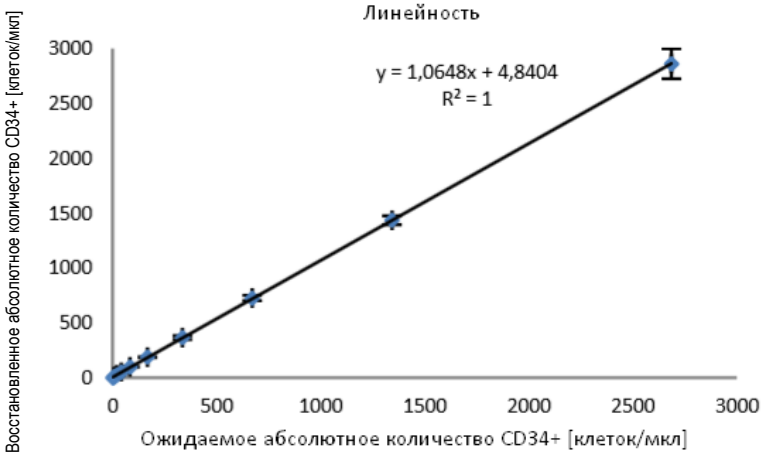
Цитометр BD FACSCanto™		Цитометр Beckman Coulter Navios	
Набор для подсчета стволовых клеток BD™ Анализ на одной платформе	CD34 QuantiFlowEx Kit, анализ на двух платформах	Анализ единой платформы с использованием Stem-kit	CD34 QuantiFlowEx Kit, анализ на двух платформах
28.2	32.1	26.2	31.3
772.2	1051.8	724.6	1073.0
3817.2	4349.7	3673.2	4780.3
18.8	17.9	18.2	18.6





Линейность

Линейность метода была подтверждена на 11 серийных разведениях, каждое в повторах. Измерения абсолютного количества CD34+ на двойной платформе (n = 3) проводились с использованием периферической цельной крови, обогащенной клетками CD34+. Образцы окрашивали с использованием набора CD34 QuantiFlowEx Kit и анализировали на цитометре BD FACSCanto™. Линейную регрессию использовали для оценки ожидаемого значения по сравнению со средним восстановленным значением для каждого разведения.



Повторяемость и воспроизводимость

Внутрилабораторная точность метода устанавливалась на одном участке двумя операторами с использованием одного проточного цитометра в два разных дня. Стандарт CD34 от Streck CDChex CD34® окрашивали и анализировали при двух разных уровнях концентрации клеток CD34+ в повторном анализе (n = 5 и n = 6). Рассчитывали и оценивали процент клеток CD34+, присутствующих в двух различных стандартах CD34 (стабилизированный образец крови). Ниже представлены объединенные средние значения, объединенное стандартное отклонение и объединенное CV (%) CD34 %, полученные двумя операторами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 6. Повторяемость и воспроизводимость с коэффициентом вариации

	n	Уровень 1 Значение	Уровень 1 SD	Уровень 1 CV (%)	Уровень 3 Значение	Уровень 3 SD	Уровень 3 CV (%)
Оператор 1	5	0.07	0.006	8.73	1.52	0.032	2.08
Оператор 2	6	0.05	0.004	9.52	1.32	0.013	0.96
Совместно	11	0.06	0.005	9.13	1.41	0.023	1.52

12. Клинические характеристики

Устройство CD34 QuantiFlowEx Kit предоставляет количественные результаты, которые используются для оценки качества тестируемой крови или ткани.

Параметры клинической эффективности, такие как диагностическая специфичность, диагностическая чувствительность, положительная прогностическая ценность, отрицательная прогностическая ценность и отношение правдоподобия, не применяются.

Нормальный диапазон значений представлен в разделе 13.

13. Ожидаемые значения

Диапазон и параметры рассчитывали на основе анализа образцов 19 пациентов на разных стадиях мобилизации CD34+ HSC.

Таблица 7. Диапазон значений для набора CD34 QuantiFlowEx

		Мин	**Макс**	**Значение**	**SD**
Абсолютное CD45+ × 103/мкл	n=19	1.5	41.6	17.7	14.6
Абсолютный CD34+ /мкл		1.38	158.08	50.8	43.2
CD34 %		0.02	2.23	0.6	0.6

14. Мешающие вещества и ограничения

Прибор не предназначен для идентификации и подсчета мезенхимальных, нейральных, эпителиальных и стволовых клеток кожи.

15. Ссылки

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) McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, et al. eds. Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford University Press, 1987.

3) Kishimoto T, Kikutani H, von dem Born AEGK, et al. eds. Leucocyte Typing VI. New York: Garland Publishing, Inc., 1997.

16. Товарные знаки

BD FACSCanto™, Trucount™, FlowJo™ являются зарегистрированными торговыми марками Becton, Dickinson and Company, CD-Chex CD34® является зарегистрированной торговой маркой Streck, Navios™, Flow-Count™ FluorSpheres является зарегистрированной торговой маркой Beckman Coulter.

17. История изменений

Версия 3, ED7080_IFU_v3 IFU

планировка изменена. Текстовые изменения в соответствии с главами новой компоновки IFU.

18. Контактная информация

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

19. Уполномоченные представители

Ответственное лицо в Великобритании

Sysmex UK Ltd
Sysmex House
Garamonde Drive
Wymbush
Milton Keynes
MK8 8DF
Великобритания
Телефон: +44 (0)333 3203460
Электронная почта: info@sysmex.co.uk

ВНИМАНИЕ: О любом серьезном происшествии, произошедшем с устройством, необходимо сообщать производителю и местному компетентному органу.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

FagoFlowEx Kit

Cat.No. ED7042

1. Целевое назначение

Набор FagoFlowEx ® предназначен для исследования фагоцитарной активности гранулоцитов путем измерения респираторных (окислительный) всплесков после их возбуждения бактерией кишечной палочки в человеческой гепаринизированной цельной крови с помощью проточной цитометрии.

2. Контекст физиологического или патологического состояния

Пациенты с иммунодефицитом первоначально обнаруживаются клинически по истории рецидивирующей инфекции. Ответственный конкретный инфекционный агент указывает на то, какая часть иммунной системы поражена. Недостатки врожденной иммунной системы состоят в основном из дисфункции комплемента и фагоцитов и серьезно снижают нашу способность бороться с инфекциями, несмотря на явно эффективный адаптивный иммунный ответ. Помимо различных дефектов миграции, наиболее распространенные генетические дефекты врожденной иммунной системы связаны с фагоцитарной и киллерной активностью нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и макрофагов, что связано с дефицитом миелопероксидазы (МПО)[1], хронической гранулематозной болезнью (ХГБ)[2] и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФГ) синдромы[3]. Все эти недостатки приводят к серьезным хроническим инфекциям, вызванным специфическими патогенами (бактериями, дрожжами и грибками), устойчивыми к стандартному лечению.

Респираторный взрыв нарушается при дефиците CGD, MPO и G6PD. В совокупности эти генетические нарушения препятствуют накоплению окислительной среды, и, следовательно, фагоциты не способны эффективно уничтожать внутриклеточные или проглоченные внеклеточные патогены. Хроническая гранулематозная болезнь (ХГ) представляет собой клинически и генетически разнообразную группу наследственных заболеваний с дефицитом многих ферментов НАДФН-оксидазного каскада, генерирующих активные кислородные радикалы, используемые для уничтожения возбудителя. Приблизительно 1/3 пациентов с ХГБ имеют аутосомно-рецессивные мутации (CYBA, NCF1, NCF2), а две трети случаев ХГБ являются результатом дефектов в Х-сцепленном гене CYBB, кодирующем субъединицу gp91phox флавоцитохрома b5584,5. Активная НАДФН-оксидаза здорового человека катализирует реакцию НАДФН с кислородом с образованием НАДФ+ и супероксидного радикала $O2^-$, который вступает в дальнейшую серию реакций с образованием синглетного кислорода и пероксида водорода, трансформируемого МПО. Пациенты с ХГБ страдают пневмонией, абсцессами кожи, тканей и органов, гнойным артритом, остеомиелитом, бактериемией/фунгемией и поверхностными кожными инфекциями, такими как флегмона или импетиго6. Кроме того, персистирующая инфекция может привести к образованию тканевых гранулем на основе явных цитокинов TNF и IFNγ, продуцируемых CD4+ Т-клетками. Важно отметить, что пациенты с ХГБ не только страдают от рецидивирующих инфекций, но и, с другой стороны, имеют чрезмерные воспалительные неинфекционные состояния7. Дефицит МПО представляет собой генетическое заболевание, характеризующееся недостатком количества или функции нижестоящего фермента миелопероксидазы, генерирующего гидроксильный радикал и гипохлорит из перекиси водорода. Гипохлорит считается наиболее эффективным смертоносным агентом, образующимся при респираторном взрыве8. Фермент G6PD находится в восходящем пути гексозомонофосфата - одном из основных процессов образования НАДФН. Это связано как с хронической несфероцитарной гемолитической анемией, так и со сниженным респираторным взрывом фагоцитов9, если активность фермента низкая. Все вышеупомянутые заболевания, связанные с функцией фагоцитов, иллюстрируют их критическую роль в удалении и уничтожении патогенов при поддержании гомеостаза в организме человека.

3. Принцип тестирования

Этот тест основан на измерении респираторного выброса нейтрофильных гранулоцитов после их стимуляции бактериями E. coli. В процессе поглощения бактерий фагоциты активируют НАДФН-оксидазу с образованием реактивных окислительных интермедиатов (респираторный взрыв). Образовавшиеся ионы гипохлорита внутри фагоцитов сильно окисляют дигидородамин 123 (DHR123) до флуоресцентного родамина 123, который обнаруживается с помощью проточного цитометра. В случае дефицита МПО DHR123 менее интенсивно окисляется другими продуктами окисления, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции стимулированных гранулоцитов. Положительный контрольный образец стимулируют с помощью ФМА (форбол 12-миристат 13ацетат), который активирует респираторный взрыв гранулоцитов без адгезии и проглатывания патогена.

4. Реагенты

• ED7042-1 E.Coli – 5 флаконов с лиофилизирован-ными бактериями кишечной палочки, 1 флакон предназначен для возбуждения 20 пробирок.

• ED7042-2 DHR123 – 5 флаконов с лиофилизиро-ванным дигидородамином 123, 1 флакон предназначен для окрашивания 60 пробирок.

• ED7042-3 ФМА – 5 флаконов с лиофилизирован-ным ФМА (форболмиристацетат), 1 флакон предназначен для возбуждения 20 положительных контролей.

• ED7042-4 Лизирующий раствор – 15 мл.

5. Необходимый материал (не входит в комплект)

• Подходящие 5 мл тестовые пробирки для окрашивания крови (например, 12×75 мм)

• Сверхчистая деминерализованная вода

6. Хранение и обращение

Хранить флакон при температуре 2–8 °C. Держите подальше от солнечного света. Не замораживать. Не делайте аликвоты. Срок годности указан на этикетке флакона и на внешней упаковке. См. раздел 9 «Процедура подготовки реагентов» для получения информации о хранении разведенных реагентов и их стабильности при использовании.

7. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования

• Предназначен для диагностики in vitro в лабораториях за пределами США и Канады. Этот комплект CE-IVD соответствует Европейской директиве 98/79/EC.

• Не используйте реагент после истечения срока годности.

• Избегайте загрязнения реагентов.

• Берегите DHR123 (ED7042-2) от длительного воздействия света.

• Содержимое флакона не должно замерзать.

• Образцы крови считаются потенциально инфекционными, и с ними следует обращаться осторожно.

• Лизирующий раствор (ED7042-4) содержит формальдегид и метанол.

H-фразы

H302+H312+H332: Вреден при проглатывании, контакте с кожей или при вдыхании.

H317: Может вызывать кожную аллергическую реакцию.

H351: Предположительно вызывает рак. P-фразы

P270: Не ешьте, не пейте и не курите при использовании этого продукта.

P280: Носите защитные перчатки/защитную одежду/защитные очки/защитную маску для лица.

P301+P312: ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: При плохом самочувствии обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.

P302+P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды с мылом.

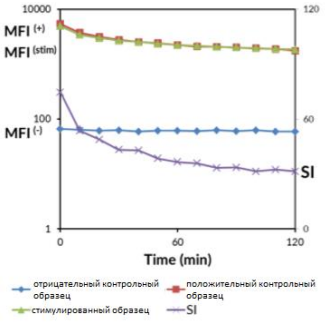
P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжайте промывать обильным количеством проточной воды.

P501: Утилизируйте содержимое/контейнер на уполномоченном предприятии по утилизации опасных отходов.

• Полную информацию о потенциальных опасностях и о том, как безопасно работать с продуктом, см. в Паспорте безопасности продукта.

• Окрашенные образцы следует анализировать в течение стандартного периода времени, но не позднее, чем через 2 часа после лизиса (см. график ниже).

График изменения средней интенсивности флуоресценции (MFI) и индекса стимуляции (SI) гранулоцитов во времени после лизиса эритроцитов.



• Проточный цитометр следует регулярно калибровать с использованием флуоресцентных микрошариков, чтобы обеспечить стабильную чувствительность детекторов

• Любое отклонение от протокола проведения процедуры анализа может привести к ложным результатам.

8. Образец

Для исследования используйте цельную человеческую гепаринизированную кровь.

Кровь необходимо собрать в пробирку с гепарином. Следуйте инструкциям производителя тюбика, чтобы обеспечить правильный объем наполнения. Антикоагулянты ЭДТА и цитрат негативно сказываются на результатах анализа. Образцы крови следует хранить при комнатной температуре. Используйте образец крови не позднее, чем через 24 часа после забора.

9. Процедура анализа

• Разведите лиофилизированные бактерии кишечной палочки на 250 мкл деминерализованной воды. Неиспользованное количество суспензии храните при температуре 2-8ºC не более 24 часов. В противном случае, количество суспензии может быть определено, заморожено (один раз), и сохранено для следующего использования при температуре ниже -20ºC. Используйте в течение 7 дней. Избегайте повторного замораживания/размораживания.

• Восстановите лиофилизированный DHR123, используя 650 мкл деминерализованной воды, и аккуратно встряхните, не взбалтывая. Хранить раствор при температуре 2-8°C, использовать в течение 8 часов. В качестве альтернативы реагент можно разделить на аликвоты, заморозить и хранить при температуре ≤ -20 °C. Используйте замороженный раствор DHR123 в течение 7 дней. Реагент выдерживает до 5 циклов замораживания/оттаивания. Хранение замороженного реагента может привести к снижению индекса стимуляции до 20 %.

•Восстановите лиофилизированный контроль стимуляции, используя 250 мкл деминерализованной воды. Хранить раствор при температуре 2-8°C, использовать в течение 24 часов. В качестве альтернативы реагент можно разделить на аликвоты, заморозить и хранить при температуре ≤ -20 °C. Используйте замороженный стимулирующий контроль в течение 7 дней. Реагент выдерживает до 5 циклов заморозки/разморозки.

•Лизирующий раствор готов к использованию.

Процедура исследования

Для проверки одного образца крови приготовьте тестовые пробирки для **негативного контроля**, **положительного контроля*** и для **образцов, возбужденных бактерией кишечной палочки.**

1. В пробирки, предназначенные для:

• **возбужденного образца** добавьте 10 мкл суспензии с бактериями кишечной палочки,

• **негативного контроля** не добавляйте ничего,

• **положительного контроля** добавьте 10 мкл PMA.

2. Добавьте 50 мкл гепаринизированной цельной крови во все пробирки и аккуратно перемешайте.

3. Добавьте 10 мкл DHR123 во все пробирки и аккуратно перемешайте.

4. Выдержите пробирки 20 минут при температуре 37ºC в водяной бане или 30 минут в воздушном инкубаторе.

5. Добавьте по 50 мкл лизирующего раствора во все пробирки, аккуратно перемешайте и инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре.

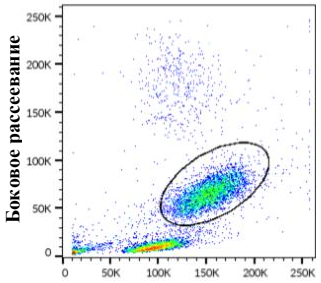
6. Добавьте во все пробирки по 1 мл деминерализованной воды, осторожно перемешайте и инкубируйте в течение 5–10 минут при комнатной температуре до лизиса эритроцитов.

Поскольку Родамин 123 быстро высвобождается из гранулоцитов, образцы необходимо **замерять как можно скорее** (не позднее, чем через 2 часа после лизиса), желательно **в стандартизированные узкие временные рамки.**

10. Анализ проточным цитометром

Проанализируйте окрашенные образцы с помощью проточного цитометра. Подсчитайте не менее 5 000–10 000 лейкоцитов на образец. Отобразите измеренные данные возбужденного образца и положительного контроля и негативного контроля на точечном графике бокового рассеяния (SSC) против прямого рассеяния (FSC). Установите ограничение вокруг гранулоцитов как показано на рисунке 1. Употребление бактерий оказывает влияние на положение гранулоцитов на точечном графике SSC-FSC. Поэтому, рекомендуется устанавливать ограничения индивидуально.

Рис. 1 Разграничение популяции гранулоцитов



Затем приведите ограниченные гранулоциты на гистограммах как показано на рисунках 2а,б,в, где по оси X представлена интенсивность флуоресценции по FITC каналу (FL1). Установите подходящие ограничения для подсчета процентного соотношения положительных и негативных гранулоцитов и их основной флуоресцентной интенсивности (MFI). Возбужденные гранулоциты, полученные при окислительном всплеске, представляют яркую флуорес-ценцию родамина 123.

11. Подсчет и интерпретация результатов

Есть два параметра, полученные в результате анализа, которые могут указывать на дефекты респираторного взрыва:

а) Относительное **количество положительных гранулоцитов**, которые продемонстрировали респираторный взрыв после возбуждения кишечной палочки.

б) **Индекс стимуляции (SI)** означает отношение MFI положительных гранулоцитов образца, возбужденной кишечной палочки, и отрицательных гранулоцитов образца отрицательного контроля (см. ниже пример расчета индекса стимуляции). Индекс стимуляции используется для приблизительного сравнения интенсивности дыхательных взрывов между образцами крови.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рис. 2а) Гистограмма гранулоцитов положительного контроля

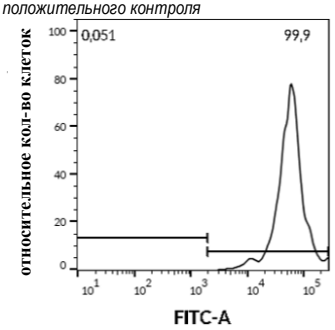
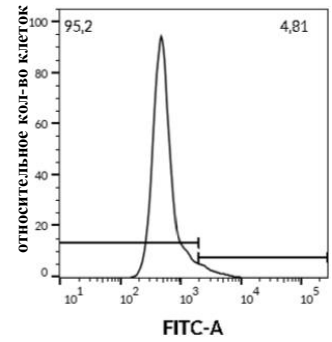
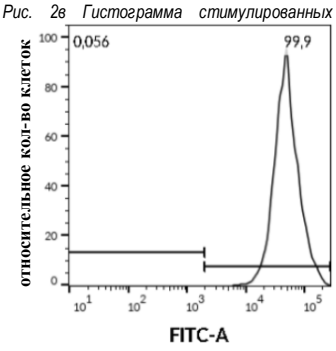


Рис. 2б) Гистограмма гранулоцитов отрицательного контроля



Популяция	Количество (%)	Значение FITC
Негативная	95.2	550
положительная	4.81	3995

Рис. 2в Гистограмма стимулированных



гранулоцитов

Популяция	Количество (%)	Значение FITC
Негативная	0.056	1224
положительная	99.9	53836

Пример расчета индекса стимуляции
Значения MFI на рисунках 2б и 2в:
Индекс стимуляции = 53836 / 550 = 98

12. Аналитические исследования
Точность (повторяемость и воспроизводимость)
Повторяемость и воспроизводимость анализа определяли по данным, измеренным пятью операторами на шести образцах крови в двух параллелях при одинаковых экспериментальных условиях. С помощью дисперсионного анализа были рассчитаны следующие параметры:
а) Для относительного количества положительных гранулоцитов
$CV^{повторяемость}$ = 1.4 %
$CV^{воспроизводимость}$ = 3.2 %
б) Для определения индекса стимуляции
$CV^{повторяемость}$ = 12.2 %
$CV^{воспроизводимость}$ = 13.6 %
Воспроизводимость анализа сильно зависит от точности работы (время инкубации, температура, пипетирование).

13.Клинические исследования
Ожидаемые значения

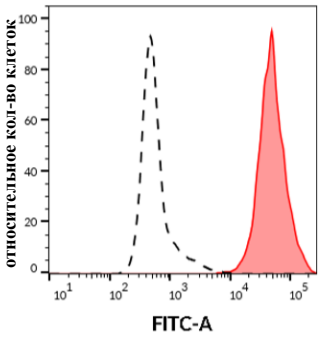
В 40 образцах периферической крови здоровых взрослых определяли **нормальный диапазон** респираторной взрывной активности гранулоцитов.

- Гранулоциты с респираторной взрывной активностью 90-100 %
- Индекс стимуляции гранулоцитов > 30

3-й процентиль	= 31
Среднее значение	= 52
97-й процентиль	= 93

Поскольку индекс стимуляции может различаться в разных лабораториях и на разных приборах, каждая лаборатория должна установить нормальный диапазон, используя свои собственные условия испытаний.

Рис. 3 Наложение гистограммы: Здоровый донор без дефекта респираторного взрыва



(SI = 98).

Необычные результаты (потенциальные дефекты респираторного взрыва)
1)Более низкий индекс стимуляции
а) Если гранулоциты демонстрируют низкий респираторный взрыв после их стимуляции с кишечной палочкой и Возбужденным Контролем (PMA), это может указывать на подозрение на наиболее частый дефект - **дефицит миелопероксидазы (МПО)**. Индекс стимуляции снижен примерно до 1/10 от нормы (рис. 4).

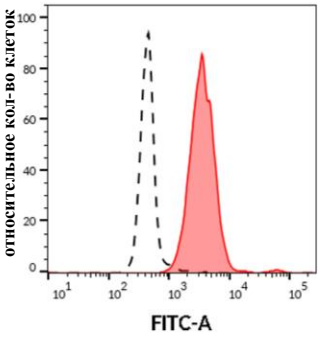


Рис. 4. Наложение гистограммы: пациент с дефицитом МПО (SI = 11).

б) Реже, если гранулоциты не проявляют респираторного взрыва или проявляют его слабо после стимуляции с кишечной палочкой и Возбужденным Контролем (PMA), это может указывать на **хроническую гранулематозную болезнь (CGD)** (рис. 5). Интенсивность респираторного взрыва (индекс стимуляции) зависит от мутации множества ферментов НАДФН-оксидазного каскада. Если в стимулированных гранулоцитах больной женщины **обнаруживаются две субпопуляции,** различающиеся интенсивностью респираторного взрыва (рис. 6), это может свидетельствовать о дефекте Х-сцепленного гена. При этом часть гранулоцитов имеет нормальную интенсивность, а вторая часть - сниженную интенсивность респираторного взрыва.

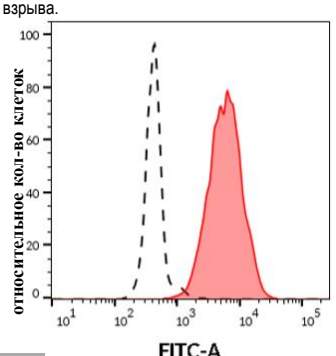
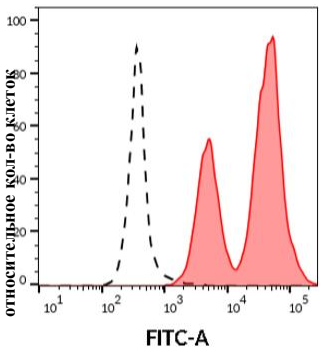


Рис. 5. Наложение гистограммы: пациент мужского пола с ХГБ (SI = 16).

Рис. 6. Наложение гистограммы: женщина-носитель Х-сцепленной мутации гена НАДФН-оксидазы. Две субпопуляции



гранулоцитов различаются по интенсивности респираторного взрыва (SIниз = 13,9, SIвысок = 125).

в) В редких случаях низкая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД), продуцирующей НАДФН, также может вызывать низкий респираторный взрыв гранулоцитов.

2) Если **положительный контроль (стимулированный Возбужденный Контроль) положительный, а тестируемый образец (стимулированный кишечной палочкой) отрицательный**, то образец крови, вероятно, содержит антикоагулянт ЭДТА или цитрат. В качестве альтернативы это может указывать на дефект пациента в адгезии или внутреннем процессе фагоцитоза.
3) Низкое относительное количество положительных гранулоцитов указывает на то, что образец крови устарел или неправильно хранится, поскольку со временем накапливается более высокий процент поврежденных гранулоцитов.

Обнаружение необычных результатов, описанных выше, указывает только на подозрение на заболевание, которое необходимо подтвердить другими тестами. Дефицит МПО может быть подтвержден внутриклеточным окрашиванием гранулоцитов с использованием мАт к МПО (например, клон CLB-MPO-1/1, кат. № 1F-635-T100). Дефекты NADPH-оксидазы (CGD) и G6PD должны быть подтверждены генетическим анализом.

14. Безопасность и гигиена труда
Антикоагулянты ЭДТА и цитрат негативно сказываются на результатах анализа. Проточный цитометр может давать ложные результаты, если устройство не подвергалось регулярной калибровке и надлежащему обслуживанию.

15. Ссылки

1.http://omim.org/entry/254600
2.http://omim.org/entry/306400
3.http://omim.org/entry/305900
4.Dinauer MC. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:89-95.
5. de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. Scand J Immunol. 2011 May;73(5):420-7.
6. Song E, Jaishankar GB, Saleh H, Jithpratuck W, Sahni R, Krishnaswamy G. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. Clin Mol Allergy. 2011 May 31;9(1):10.
7. Kuijpers T, Lutter R. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. Cell Mol Life Sci. 2012 Jan;69(1):7-15.
8. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol. 2005 May;77(5):598-625.
9. van Bruggen R, Bautista JM, Petropoulou T, de Boer M, van Zwieten R, Gómez-Gallego F, Belohradsky BH, Hartwig NG, Stevens D, Mason PJ, Roos D. Deletion of leucine 61 in glucose-6phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. Blood. 2002 Aug 1;100(3):1026-30.

16. Производитель

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic
info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

17. Бренд
N/A
18. История изменений
- Версия 1, ED7042_IFU_v1
Изначальный выпуск
- Версия 2, ED7042_IFU_v2
В раздел «Меры предосторожности» добавлен новый текст: «Предназначен для диагностики in vitro в лабораториях за пределами США и Канады. Этот набор CEIVD соответствует Европейской директиве по медицинскому оборудованию для диагностики in vitro 98/79/EC».
- Версия 3, ED7042_IFU_v3
Введены символы СГС, H- и P-фразы.
- Версия 4, ED7042_IFU_v4
Представлены сведения о восстановлении лиофилизированного DHR123, добавлен текст «осторожно встряхнуть (не взбалтывать)».
- Версия 5, ED7042_IFU_v5
Почтовый индекс производителя изменен с 25242 на 25250. «Центрифуга с ротором, подходящим для пробирок» опущен в разделе Необходимые материалы не поставляются.
- Версия 6, ED7042_IFU_v6
Изменился логотип компании. Компоновка IFU изменена. Фраза «беречь от солнечного света» добавлена в раздел «Хранение». В раздел «Образцы» добавлен текст «Следуйте инструкциям производителя пробирки, чтобы обеспечить правильный объем наполнения». Стабильность использования изменена в соответствии с доступными данными. График изменения MFI и SI во времени после добавления лизиса эритроцитов. Дополнительные параметры (медиана, процентили) добавлены к ожидаемым значениям.
- Версия 7, ED7042_IFU_v7
Текст Ограничения использования продукта был уточнен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

FagoFlowEx Kit

100 тестов| Кат.ном. ED7042

Инструкция по эксплуатации
Версия: ED7042_IFU_v7_EN
Дата выпуска: 21.01.2020

EN

Символы

REF	Каталожный номер
LOT	Номер партии
	Использовать до
	Температурные пределы
	Беречь от солнечного света
	Медицинское устройство для диагностики in vitro
IVD	Маркировка CE соответствия
CE	Ознакомьтесь с инструкцией по использованию
	Производитель

Продукт предназначен для диагностики in vitro. Диагностическое или терапевтическое применение in vivo строго запрещено.
Продукция не может быть использована для перепродажи или передачи третьим лицам как самостоятельный продукт или как производственный компонент другого продукта без письменного согласия EXBIO Praha, a.s.
EXBIO Praha, a.s. не будет нести ответственность за нарушение патентных прав или любые другие нарушения прав интеллектуальной собственности, которые могут произойти при использовании продуктов. Заказы на все продукты принимаются в соответствии с Условиями, доступными на сайте www.exbio.cz. EXBIO, логотип EXBIO и все другие товарные знаки являются собственностью EXBIO Praha, a.s..

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

EXCELLYSE Easy
100 мл | Кат.Ном. **ED7066**

IVD CE

Инструкция по эксплуатации:
Версия ED7066_IFU_v7_EN
Дата издания: 15-02-2023

Символы

IVD	Медицинское устройство для диагностики in vitro		Беречь от солнечного света
CE	Маркировка соответствия CE		Хранить в сухом месте Беречь от дождя
	Производитель	CONTENTS	Содержание
UDI	Уникальный идентификатор устройства		Осторожность
	Ознакомьтесь с инструкцией по использованию	CONC 10×	Концентрированный раствор (10x)
REF	Номер по каталогу		
LOT	Код партии		
	Использовать до		
	Температура хранения		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Назначение

EXCELLYSE Easy — это лизирующий раствор, предназначенный для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов после окрашивания периферической цельной крови человека антителами, конъюгированными с флуорохромом, перед анализом проточной цитометрии.

Что обнаруживается и/или измеряется

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

Функция устройства

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор, предназначенный для диагностических процедур in vitro, связанных с анализом проточной цитометрии.

Контекст физиологического или патологического состояния

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

Тип анализа

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

Требуемый тип образца

Образец периферической цельной крови человека, обработанной антикоагулянтами.

Тестируемая популяция

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

2. Предполагаемый пользователь

Устройство предназначено только для профессионального лабораторного использования. Не для тестирования у пациента или самотестирования.

Требования к квалификации

Предполагаемый пользователь должен обладать новейшими знаниями в области анализа клеток человека методом проточной цитометрии, стандартными лабораторными методами, включая навыки пипетирования, безопасного и надлежащего обращения с образцами, полученными из человеческого тела. Предполагаемый пользователь должен соответствовать стандарту EN ISO 15189 или другим национальным стандартам, где это применимо.

3. Принцип тестирования

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор, вызывающий гипотонический лизис эритроцитов при сохранении лейкоцитов для анализа методом проточной цитометрии.

4. Реагент(ы) в комплекте

Содержимое

Устройство EXCELLYSE I рассчитано на лизирование 1000 проб крови и поставляется со следующими реагентами:

1 флакон (100 мл), содержащий готовый к использованию раствор.

5. Материалы (не входят в комплект)

Пробирки с круглым дном 12 x 75 мм.

Деионизированная вода (х.ч.)

Фосфатно-солевой буфер (1X PBS), pH 7,4 (0,2 г/л KH_2PO_4, 1,42 г/л $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 8,0 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl)

Соответствующие первичные/вторичные антитела, меченные флуоресцентными красителями

6. Необходимое оборудование

Автоматическая пипетка с одноразовыми наконечниками (50–100 мкл) для дозирования образцов и реагентов.

Дозатор жидкости или пипетка с одноразовыми наконечниками (0,2–0,5 мл) для дозирования PBS.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Градуированные цилиндры для измерения объема деионизированной воды и реагента EXCELLYSE Easy для приготовления лизирующего раствора в рабочей концентрации (1X)
Центрифуга
Вихревой смеситель
Проточный цитометр

7. Хранение и обращение.

Хранить при температуре 2–25 °C.
Избегайте длительного воздействия света.
Не замораживать.
См. раздел 10 «Процедура (приготовление реагентов)» для получения информации о стабильности при использовании и сроке хранения после первого открытия, а также об условиях хранения и стабильности рабочих растворов (если применимо).

8. Предупреждения, меры предосторожности и ограничения использования

Классификация опасностей СГС

ВНИМАНИЕ: EXCELLYSE Easy (ED7066) содержит 2,2-оксибисэтанол (номер CAS 111-46-6), формальдегид (номер CAS 50-00-0) и метанол (номер CAS 67-56-1) в концентрациях, классифицированных как опасные.

Эмблема	Меры предосторожности
 	Опасность
H-фразы	H315 Вызывает раздражение кожи. H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию. H319 Вызывает серьезное раздражение глаз. H335 Может вызывать раздражение дыхательных путей. H341 Предположительно вызывает генетические дефекты. H350 Может вызывать рак. H371 Может вызвать повреждение органов. H373 Может вызвать повреждение почек в результате длительного или многократного воздействия при проглатывании. H302+H312+H332 Вредно при проглатывании, попадании на кожу или при вдыхании.
P-фразы	P201 Перед использованием получите специальные инструкции. P260 Не вдыхать пары. P264 После работы тщательно вымыть руки и открытые части тела. P280 Надевайте защитные перчатки/защиту глаз/лица. P362+P364 Снять загрязненную одежду и постирать ее перед повторным использованием. P301+P312 ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Если вы плохо себя чувствуете, обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/к врачу. P302+P352 ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды с мылом. P305+P351+P338 ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжайте полоскание. P308+P313 ЕСЛИ подверглись воздействию или обеспокоены: Обратитесь за медицинской помощью/советом. P314 Обратитесь за медицинской помощью/советом, если почувствуете недомогание. P333+P313 При появлении раздражения кожи или сыпи: Обратитесь за медицинской помощью.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Обратитесь к паспорту безопасности (SDS), доступному на странице продукта на сайте www.exbio.cz, для получения полной информации о рисках, связанных с химическими веществами и смесями, содержащимися в продукте, а также о том, как с ними следует обращаться и утилизировать.

Биологическая опасность

Биологические образцы человека, образцы крови и любые материалы, вступающие с ними в контакт, всегда считаются инфекционными материалами. Используйте средства индивидуальной защиты и обеспечения безопасности, чтобы избежать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. Соблюдайте все применимые законы, правила и процедуры по обращению и утилизации инфекционных материалов.

Свидетельства ухудшения

Обычно поставляемый реагент выглядит как прозрачная жидкость. Не используйте реагент, если вы заметили какие-либо изменения во внешнем виде, например, помутнение или признаки выпадения осадка.

Ограничение использования

Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке продукта.

9. Образец

Используйте венозную периферическую кровь, собранную в сосуд для образцов, классифицированный как медицинское устройство, с антикоагулянтом ЭДТА или гепарином.

10. Процедура

Приготовление предоставленного реагента(ов)

Перед использованием доведите реагент до комнатной температуры. Реагент имеет 10-кратную концентрацию и перед использованием должен быть разбавлен деионизированной водой (1 объем концентрированного раствора и 9 объемов деионизированной воды). После первого вскрытия реагент сохраняет свои эксплуатационные характеристики до истечения срока годности при хранении в заявленных условиях в оригинальной первичной упаковке. Разбавленный лизирующий раствор (1X) стабилен в течение 1 месяца при хранении в дозаторе для жидкости или закрытом контейнере при комнатной температуре.

Подготовка необходимых, но не предоставляемых материалов

Перед использованием доведите деионизированную воду и 1X PBS до комнатной температуры.

Контроль качества

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

Протокол лизирования/лизирования без промывки

1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Следуйте инструкциям производителя антител по окрашиванию цельной крови.
3. Добавьте 450–1000 мкл разбавленного лизирующего раствора на 50 мкл цельной крови. Перемешайте содержимое пробирки вихревой мешалкой.
4. Инкубируйте около 5–10 минут, пока размытый раствор образца крови не станет прозрачным.
5. Немедленно проанализируйте обработанный образец с помощью проточного цитометра. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, храните его при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 24 часов.

Протокол лизиса/промывки

1. Для каждого образца промаркируйте пробирку с круглым дном размером 12 × 75 мм соответствующей идентификацией образца.
2. Следуйте инструкциям по окрашиванию цельной крови на антитела.
3. Добавьте 1000 мкл разбавленного лизирующего раствора на 50 мкл цельной крови. Перемешайте содержимое пробирки вихревой мешалкой.
4. Инкубируйте около 5–10 минут, пока размытый раствор образца крови не станет прозрачным.
5. Центрифугируйте пробирку в течение 5 минут при 300 g.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

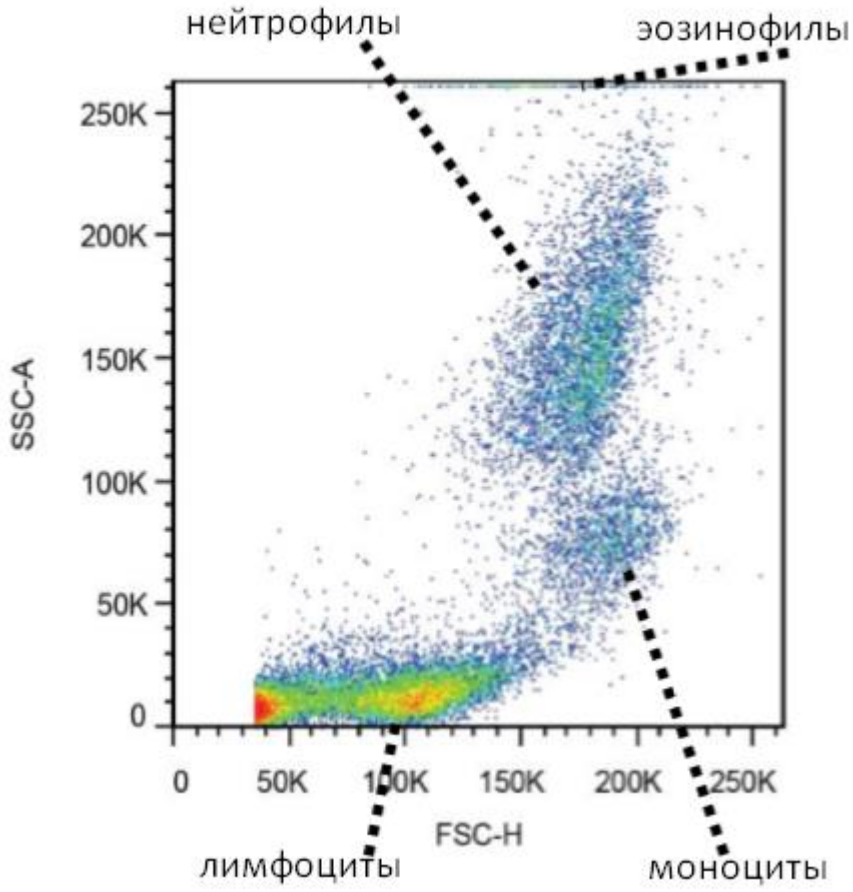
6. Декантируйте надосадочную жидкость и ресуспендируйте осадок в 0,2–0,5 мл 1X PBS.
7. Немедленно проанализируйте обработанный образец с помощью проточного цитометра. Если окрашенный образец не будет получен немедленно, храните его при температуре 2–8 °C в темноте и анализируйте в течение 24 часов.

Анализ проточной цитометрии

Проточный цитометр, выбранный для использования с устройством EXCELLYSE Easy, необходимо регулярно калибровать с использованием флуоресцентных микрогранул для обеспечения стабильной чувствительности детекторов в соответствии с инструкциями производителя цитометра. При неправильном обслуживании проточный цитометр может давать ложные результаты. См. технические характеристики цитометров производителя лазеров и детекторов флуоресценции в соответствии с характеристиками возбуждения и излучения флуорохромов в разделе 6 «Необходимое оборудование». Установите напряжение на интересующих детекторах флуоресценции перед анализом окрашенных образцов. Напряжение на детекторе ФЭУ должно быть установлено достаточно высоким, чтобы минимум событий отрицательного окрашивания мешал 0-му каналу на оси флуоресценции. Также напряжение детектора ФЭУ не должно превышать значений, при которых положительные события смещаются к правой оси. Компенсируйте сигналы флуоресценции между детекторами до или после сбора данных. Данные могут быть неправильно интерпретированы, если сигналы флуоресценции компенсируются неправильно или ворота расположены неточно. Для анализа измеренных данных можно использовать программное обеспечение цитометра, разработанное производителем, или программное обеспечение, предназначенное для автономного анализа данных цитометрии (например, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Репрезентативные данные

Рисунок 1. Двумерная точечная диаграмма плотности, показывающая скопления лейкоцитов периферической крови EXCELLYSE. Образец, обработанный методом простого лизирования/без промывки, анализируется на цитометре BD FACSCanto™ II.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 2. Профиль окрашивания цельной крови, окрашенной антителом, меченным анти-CD45 PerCP, обработанной по протоколу лизирования/без промывки и проанализированной на цитометре BD FACSCanto™ II.

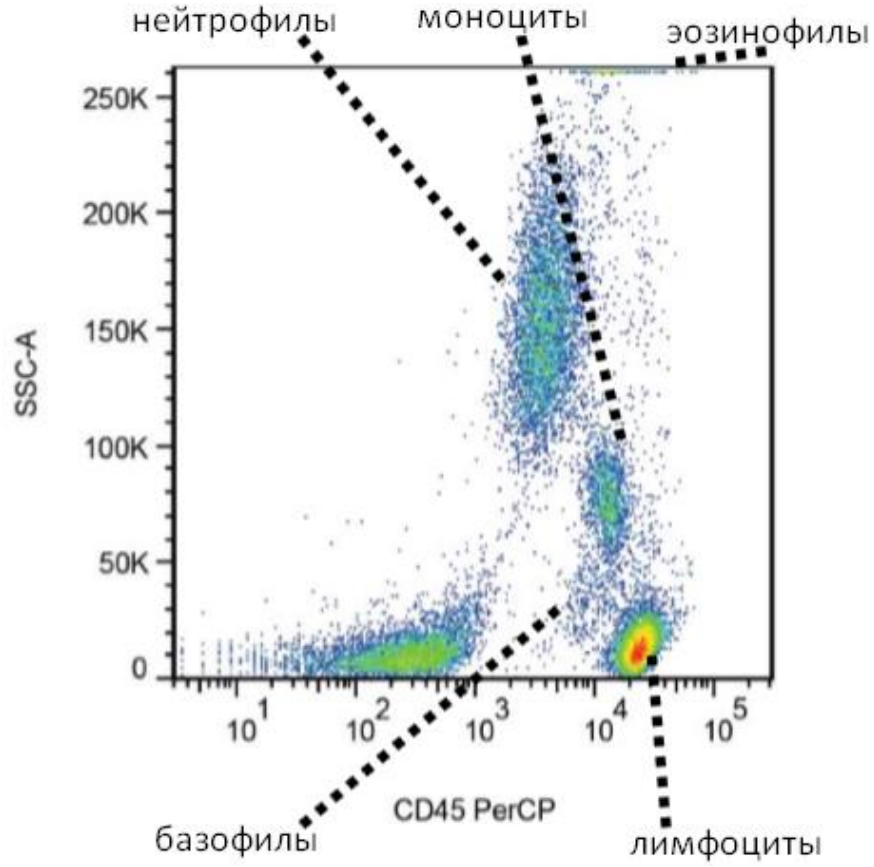
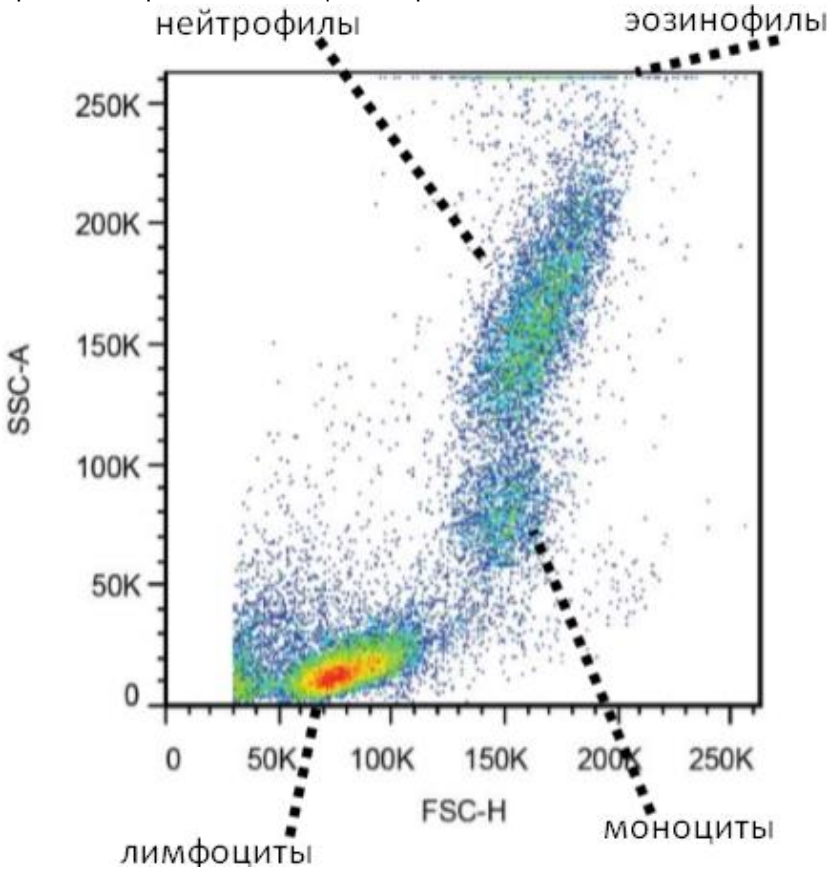
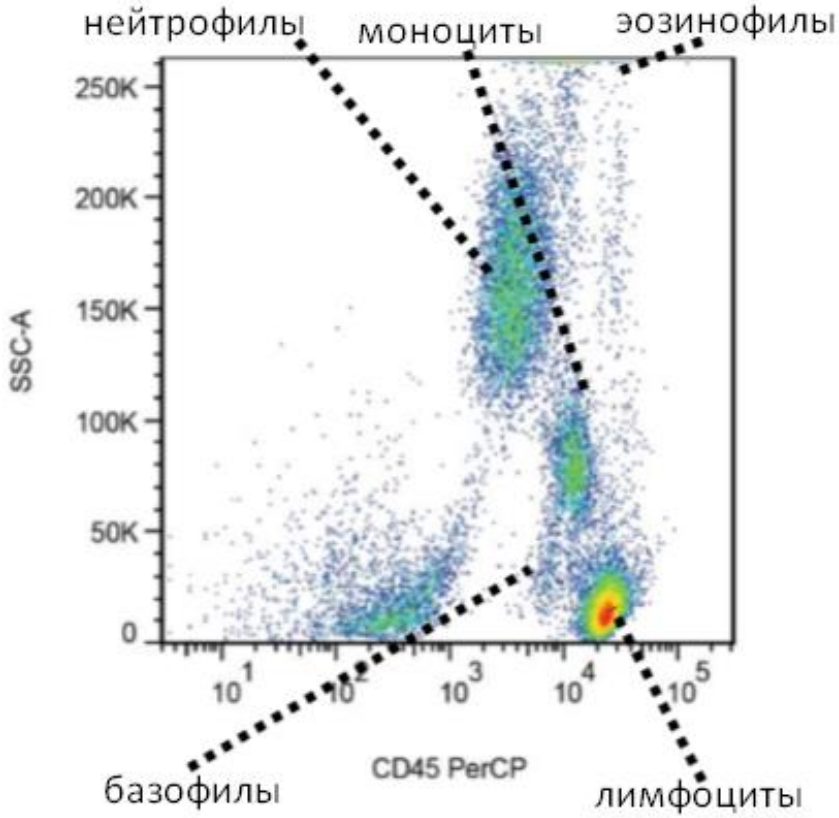


Рисунок 3. Двумерная точечная диаграмма плотности, показывающая скопления лейкоцитов периферической крови образца EXCELLYSE, обработанного методом легкого лизирования/промывки, и проанализированного на цитометре BD FACSCanto™ II.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 4. Профиль окрашивания цельной крови, окрашенной антителом, меченным анти-CD45 PerCP, обработанной по протоколу лизирования/промывки и проанализированной на цитометре BD FACSCanto™ II.



Расчет и интерпретация аналитических результатов

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

11. Аналитическая деятельность

Работоспособность устройства характеризовалась восстановлением лейкоцитов, стабильностью образца во времени после его обработки, а также межпробирочной вариабельностью количества T-, B-, NK-лимфоцитов, выявленных и подсчитанных с помощью устройства CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell 4. -цвет.

Восстановление лейкоцитов

Образцы с антикоагулянтами ЭДТА (n=13) и гепарином (n=5) обрабатывали с помощью EXCELLYSE Easy и анализировали в режиме предварительного разведения на автоматическом гематологическом анализаторе SYSMEX XN1000. Восстановление определяли как отношение количества лейкоцитов в обработанном образце к количеству лейкоцитов в цельной крови перед лизисом. Псевдообработанные образцы (нелизированные, нецентрифугированные, разбавленные PBS) анализировались параллельно.

Таблица 1. Восстановление лейкоцитов в образцах крови, обработанных EXCELLYSE Easy

	восстановление WBC	
	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
Без промывки		
ЭДТА	94	5
Гепарин	95	2
Псевдо-обработка	94	3
С промывкой		
ЭДТА	93	4
Гепарин	94	3
Псевдо-обработка	97	2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Стабильность количества лейкоцитов во времени после обработки пробы
Образцы антикоагулянтов ЭДТА (n=9) и гепарина (n=5) были обработаны EXCELLYSE Easy. Количество лейкоцитов анализировали сразу же в режиме предварительного разведения автоматического гематологического анализатора SYSMEX XN1000 и снова после 24 часов хранения (в течение ночи) в холодильнике. Изменение указывается в процентах (%) увеличения или уменьшения.

Таблица 2. Изменение количества лейкоцитов между образцами EXCELLYSE Easy Processed, анализируемыми сразу и через 24 часа хранения.

	Относительное изменение количества WBC	
	Среднее значение (%)	Стандартное отклонение (%)
Без промывки		
ЭДТА	-1	2
Гепарин	-1	3
С промывкой		
ЭДТА	0	5
Гепарин	2	2

Стабильность количества Т-, В-, NK-лимфоцитов во времени после обработки пробы
Образцы антикоагулянтов ЭДТА (n=1) и гепарина (n=1) окрашивали в гексапликатах с использованием устройства CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell 4-color и обрабатывали EXCELLYSE Easy. Анализы проточной цитометрии процентного содержания Т-, В-, NK-лимфоцитов анализировали сразу в проточном цитометре BD FACSCanto™ II и снова после 24 часов хранения (в течение ночи) в холодильнике. Для обоих измерений сообщаются значения количества и CV (%).

Таблица 3. Процентное содержание Т-, В-, NK-лимфоцитов в образцах EXCELLYSE Easy обрабатываемых, анализируемых сразу и после 24 часов хранения.

	Встречаемость лимфоцитов (%)					
	CD3		CD16+56		CD19	
	Значение	CV(%)	Значение	CV(%)	Значение	CV(%)
Без промывки						
Немедленный анализ гепарина	75.2	0.3	13.3	0.9	8.2	2.2
Гепарин через 24 часа	78.2	0.9	12.2	5.7	8.4	3.5
Немедленный анализ ЭДТА	85.3	0.6	7.6	1.7	3.5	1.7
ЭДТА через 24 часа	87.8	0.5	70	4.1	3.5	5.0
С промывкой						
Немедленный анализ гепарина	75.1	0.4	14.6	0.7	8.5	2.0
Гепарин через 24 часа	76.2	0.4	13.9	2.4	8.6	2.4
Немедленный анализ ЭДТА	85.5	0.2	9.8	0.6	3.0	4.0
ЭДТА через 24 часа	85.5	0.2	9.8	0.6	3.0	4.0

Повторяемость (вариативность от пробирки к пробирке)
Повторяемость измеряли как вариабельность относительного количества Т-, В-, NK-лимфоцитов от пробирки к пробирке. Подсчет субпопуляций лимфоцитов определяли путем окрашивания цельной крови четырехцветным реагентом (CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell, 4 цвета). Гексапликаты образцов с антикоагулянтами ЭДТА (n=5) и гепарином (n=5) обрабатывали с помощью протоколов EXCELLYSE Easywash и nowash и анализировали на цитометрах Beckmann Coulter DxFLEX и BD FACSCanto™ II.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4. Изменение количества Т-, В- и NK-лимфоцитов в разных пробирках в образцах, обработанных EXCELLYSE Easy и проанализированных на цитометре BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II	Встречаемость лимфоцитов (%)					
	CD3		CD16+56		CD19	
	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)
Без промывки						
Гепарин	73-80	0.6	8-19	2.7	7-13	2.5
ЭДТА	58-75	0.7	11-28	2.2	4-19	3.1
С промывкой						
Гепарин	58-77	0.5	9-31	2.0	4-20	1.7
ЭДТА	77-81	0.5	8-20	2.2	7-14	2.1

Таблица 5. Изменение количества Т-, В-, NK-лимфоцитов в разных пробирках в образцах, обработанных EXCELLYSE Easy и проанализированных на цитометре Beckmann Coulter DxFLEX

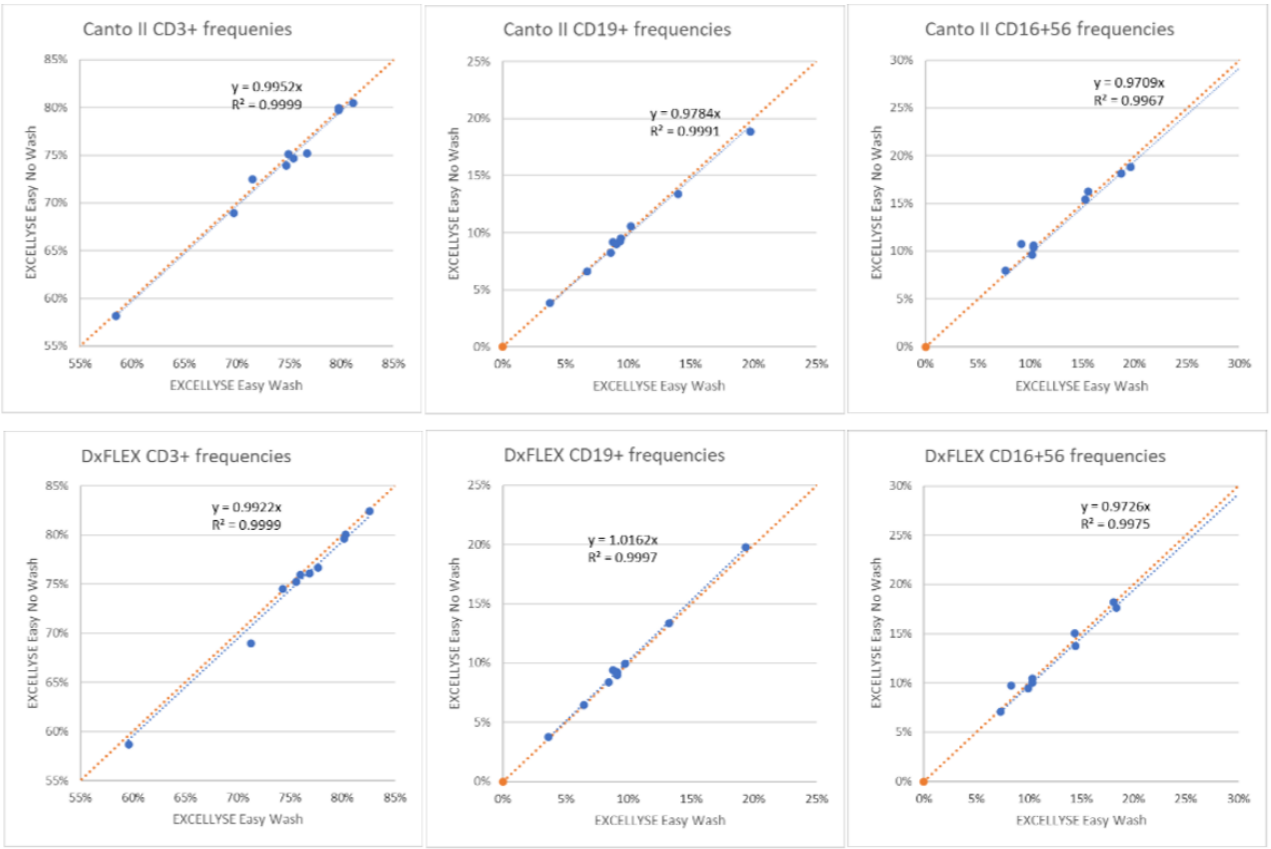
DxFLEX	Встречаемость лимфоцитов (%)					
	CD3		CD16+56		CD19	
	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)	Диапазон	CV(%)
Без промывки						
Гепарин	75-82	0.6	7-18	2.3	6-13	3.2
ЭДТА	59-77	0.6	10-28	1.5	4-20	2.3
С промывкой						
Гепарин	74-83	0.3	7-18	2.0	6-13	2.6
ЭДТА	60-78	0.5	8-30	1.7	4-19	2.4

Корреляция между отсутствием промывуи и протоколами промывки

Гексапликаты антикоагулянтов ЭДТА (n=5) и гепарина (n=5) окрашивали четырехцветным реагентом (CE IVD ED7735 KOMBITEST B/NK Cell, 4 цвета), обработанным по протоколам EXCELLYSE Easywash и без промывки. Образцы немедленно анализировали на цитометрах Beckmann Coulter DxFLEX и BD FACSCanto™ II.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 5. Сравнение относительного количества Т-клеток, В-клеток и NK-клеток в образцах, обработанных с помощью EXCELLYSE. Простая промывка и процедура без промывки. Образцы анализировали в цитометрах BD FACSCanto™ II (верхний ряд) и Beckmann Coulter DxFLEX (нижний ряд).



Воспроизводимость

N/A.

12. Клинические характеристики

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор. Он не дает результатов, которые можно соотнести с конкретным клиническим состоянием или физиологическим или патологическим процессом.

13. Ожидаемые значения

N/A. Реагент представляет собой лизирующий раствор.

14. Мешающие вещества и ограничения

Протокол промывки показывает более низкое восстановление лейкоцитов из-за центрифугирования и декантации надосадочной жидкости. Использование вакуумной аспирации для удаления супернатанта может привести к непредсказуемой потере клеток и изменению показателей восстановления лейкоцитов.

15. Ссылки

N/A.

16. Товарные знаки

BD FACSCanto™ II и FlowJo™ — зарегистрированные торговые марки Becton, Dickinson and Company, Sysmex™ — зарегистрированная торговая марка Sysmex Corporation, VenturiOne® — зарегистрированная торговая марка Applied Cytometry, Infinicyt™ — зарегистрированная торговая марка Cytognos S.L..

17. История изменений

Версия 7, ED7066_IFU_v7

Изменение объема разбавленного лизирующего раствора на этапе № 3 раздела 10. Процедура (протокол лизирования/без промывки) с 450 мкл на 450-1000 мкл. Изменен макет IFU, тексты

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

адаптированы в соответствии с правилами IVD. Добавлена дополнительная информация о производительности устройства.

18. Контактная информация

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

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

19. Уполномоченные представители

N/A.

ВНИМАНИЕ: О любом серьезном происшествии, произошедшем с устройством, необходимо сообщать производителю и местному компетентному органу.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru