
BD Multitest™ 6-Color TBNK

50 testów — nr katalogowy 644611

50 testów z BD Trucount™ Tubes— nr katalogowy 337166

23-10834(15)
2023-07
Polski



1. PRZEZNACZENIE

Odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK z opcjonalnymi probówkami BD Trucount™ Tubes jest sześciokolorowym odczynnikiem do stosowania w identyfikowaniu i określaniu udziałów procentowych i liczb bezwzględnych komórek T, B oraz naturalnych zabójców (NK), a także subpopulacji CD4 i CD8 komórek T w krwi obwodowej na cytometrze przepływowym BD wyposażonym w następujące elementy:

- Przynajmniej 488 nm niebieski laser i 640 nm czerwony laser
- Możliwość wykrywania rozproszenia do przodu (FSC) i na boki (SSC)
- Przynajmniej 6-kolorową fluorescencję
- Oprogramowanie do zbierania i analizowania danych

Zastosowania kliniczne

Określanie procentowej lub bezwzględnej liczby CD3⁺CD4⁺ limfocytów T jest wykorzystywane do monitorowania osób zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV). U osób z wirusem HIV w miarę postępów infekcji występuje zwykle stały spadek liczb limfocytów T CD3⁺CD4⁺ liczb bezwzględnych¹.

Określanie odsetka lub liczby bezwzględnej CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ limfocytów T lub CD3⁺CD8⁺ limfocytów T lub limfocytów B CD19⁺ jest stosowane w celu charakteryzacji lub monitorowania pewnych postaci niedoboru odpornościowego i chorób autoimmunologicznych^{1,2}.

Określanie odsetka lub liczby bezwzględnej CD3⁺ i CD16⁺ i/lub CD56⁺ limfocytów NK jest stosowane w ocenie immunologicznej osób zdrowych hematologicznie lub pacjentów z lub z podejrzeniem niedoborów odporności lub innych chorób o podłożu immunologicznym^{1,3}.

2. PODSUMOWANIE TESTU

Ludzka krew obwodowa zawiera trzy typy limfocytów: T, B i limfocyty NK. Mają one odrębne funkcje biologiczne i mogą być identyfikowane na podstawie różnic ekspresji antygenów na powierzchni komórek.

Limfocyty Subpopulacja limfocytów T i B specyficznych dla antygenów ma inne role w adaptacyjności odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty T pomocnicze/indukujące wydzielają cytokiny, które pomagają regulować aktywność innych limfocytów T, jak również limfocytów B. Limfocyty T supresorowe/cytotoksyczne tłumią aktywność limfocytów T lub rozpoznają i wykonują listę zainfekowanych lub nieprawidłowych komórek. B specyficzne dla antygenów produkują i wydzielają immunoglobuliny w celu regulacji hormonalnej odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty NK pośredniczą w antygenowej nieswoistej cytotoksyczności wobec zainfekowanych lub nieprawidłowych komórek⁴.

Odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK z lub bez probówek BD Trucount™ Tubes jest oznaczeniem ilościowym przeznaczonym do stosowania przez pracowników laboratoriów w celu identyfikowania i zliczania następujących subpopulacji limfocytów T, B i NK:

- Limfocyty T CD3⁺
- CD3⁺CD4⁺ limfocyty T pomocnicze/indukujące
- CD3⁺CD8⁺ limfocyty T supresorowe/cytotoksyczne
- CD19⁺ limfocyty B
- CD3⁻CD16⁺CD56⁺ limfocyty NK

Zautomatyzowane przygotowanie i akwizycję próbek można osiągnąć odpowiednio za pomocą systemu przygotowania próbek BD FACSDuet™ i podajników BD. Analiza danych może być przeprowadzona przy użyciu wstępnie zdefiniowanego szablonu i automatycznego bramkowania, które w razie potrzeby może być ręcznie dostosowane przez użytkownika.

Zasada działania

Odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK składa się z siedmiu przeciwciał monoklonalnych, z których każde sprzężone jest z określonym fluorochromem. Odczynnik jest dodany do krwi obwodowej i inkubowany, umożliwiając każdemu z przeciwciał monoklonalnych w odczynniku na wiązanie się z określonym antygenem na powierzchni komórek. Po inkubacji, roztwór do lizy BD FACS™ Lysing Solution jest dodawany w celu zlizowania czerwonych krwinek w próbce. Komórki są zbierane w cytometrze przepływowym BD przy użyciu odpowiedniego oprogramowania. Podczas zbierania komórki przechodzą przez wiązkę laserową i rozpraszają światło lasera. Wybarwione komórki są fluorescencyjne. Te sygnały rozproszenia i fluorescencji wykryte przez urządzenie dostarczają informacji na temat rozmiaru komórek, wewnętrznego stopnia złożoności i względnej intensywności fluorescencji. Odczynniki BD Multitest™ wykorzystują wyzwolenie fluorescencji, umożliwiając bezpośrednie bramkowanie fluorescencyjne populacji limfocytów w celu zmniejszenia zanieczyszczenia nielizowanymi lub występującymi w postaci jądrowej czerwonymi krwinkami na bramce. Oprogramowanie i moduł oznaczenia BD Multitest™ 6-Color TBNK są używane w celu analizy danych i raportowania wyniku.

Podczas określania liczby bezwzględnej komórek, wyrażonej jako liczba komórek/μl, dokładna objętość próbki oraz odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK są dodawane do probówki BD Trucount™ Tube. Probówka BD Trucount™ Tube zawiera liofilizowany osad fluorescencyjnych kulek. Podczas inkubacji odczynnika i próbki, osad kulek rozpuszcza się, uwalniając znaną liczbę fluorescencyjnych kulek, które można odróżnić od komórek na podstawie intensywności fluorescencji. Po lizie czerwonych krwinek, próbka jest zbierana na cytometrze przepływowym BD. Oprogramowanie określa bezwzględną liczbę komórek, porównując zdarzenia na poziomie komórkowym i raportując liczbę bezwzględną komórek w raporcie laboratoryjnym.

Aby zapoznać się z zasadami działania cytometru przepływowego, należy zapoznać się z instrukcją obsługi (IFU) danego urządzenia.

3. ODCZYNNIK

Skład odczynników

Odczynnik zawiera następujące sprzężone przeciwciała:

Tabela 1 Skład odczynników

Przeciwciało	Fluorochrom	Klon	Izotyp	Stężenie (µg/ml)
CD3	FITC	SK7 ^{5,6}	IgG ₁	2,3
CD16	PE	B73.1 ⁷	IgG ₁	1,65
CD56	PE	NCAM16.2 ⁸	IgG _{2b}	1,1
CD45	PerCP-Cy5.5	2D1 ⁹	IgG ₁	6,0
CD4	PE-Cy7	SK3 ^{10,11,12}	IgG ₁	1,5
CD19	APC	SJ25C1 ¹³	IgG ₁	2,3
CD8	APC-Cy7	SK1 ^{10,11}	IgG ₁	6,3

CD3 (SK7) rozpoznaje łańcuch epsilon antygeny CD3 kompleksu receptora przeciwciała komórki T (TCR)¹⁴. Antygen CD3 jest obecny w limfocytach T i jest niekowalencyjnie związany z α/β lub γ/δ TCR¹⁵. CD3 minimalnie reaguje z innymi populacjami komórek¹⁶.

CD16 i CD56 wspólnie ułatwiają identyfikację populacji limfocytów NK.

Przeciwciało CD16 (B73.1) identyfikuje antygen ludzkiego limfocyta NK będący receptorem Fc IgG^{17,18,19}. CD16 reaguje również z neutrofilami²⁰ i z granulocytami w różnym stopniu¹⁷.

CD56 (NCAM16.2) rozpoznaje pozakomórkową immunoglobulinopodobną domenę neuronalnych cząsteczek adhezyjnych (NCAM)^{21,22,23}. CD56 reaguje również z około 5% limfocytów krwi obwodowej CD3²².

CD45 (2D1) rozpoznaje wszystkie izoformy z rodziny wspólnych antygenów leukocytarnych (LCA)/T200²⁴. Antygen CD45 występuje we wszystkich ludzkich leukocytach, w tym limfocytach, monocytach, granulocytach, eozynofilach i bazofilach w krwi obwodowej²⁴. Donoszono, że CD45 słabo reaguje z dojrzałymi krążącymi erytrocytami i płytkami^{24,25}.

CD4 (SK3) identyfikuje antygen oddziałujący z cząstkami klasy II MHC i jest głównym receptorem ludzkiego wirusa HIV^{26,27}. Antygen CD4 występuje na limfocytach T pomocniczych/indukujących i występuje w małej gęstości na powierzchni monocytów i w cytoplazmie monocytów¹⁰.

CD19 (SJ25C1) rozpoznaje antygen, który występuje w ludzkich limfocytach B we wszystkich etapach dojrzewania^{11,28,29}, ale zanika na komórkach plazmatycznych²⁹. CD19 nie reaguje z dzielącymi się lub aktywnymi limfocytami T, granulocytami lub monocytami³⁰.

CD8 (SK1) rozpoznaje antygen, który oddziałuje z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy I, co skutkuje zwiększoną adhezją między limfocytami T CD8⁺ i komórkami docelowymi oraz zwiększoną aktywacją spoczynkowych limfocytów T^{31,32,33}. Antygen CD8 jest obecny w limfocytach T supresorowych/cytotoksycznych. CD8 rozpoznaje również subpopulację limfocytów NK³⁴.

Środki ostrożności

- Odczynnik powinien być przezroczysty. Odczynnik nie należy używać w przypadku zaobserwowania jakichkolwiek zmian wyglądu. Opady, zmętnienie lub zmiana koloru wskazują na niestabilność lub pogorszenie.
- Odczynnik przeciwciała zawiera azydek sodu, pełniący rolę środka konserwującego. Należy jednak uważać, aby unikać zanieczyszczeń mikroorganizmami, które mogą spowodować błędne wyniki.
- W przypadku używania probówek BD Trucount™ Tubes, skalibrować pipety tak, aby dostarczały dokładnie 50 µl próbki lub zastosować technikę pipetowania odwrotnego (patrz Pipetowanie odwrotne na stronie 8). Więcej informacji można znaleźć w instrukcjach podanych przez wytwórcę pipety.

- Liczba kulek zależy od serii probówek BD Trucount™ Tubes. Kluczowe znaczenie ma stosowanie podczas wprowadzania wartości do oprogramowania lub ręcznego obliczania liczb bezwzględnych liczby kulek podanej na bieżącej serii probówek BD Trucount™ Tubes. Podczas oznaczenia nie należy używać jednocześnie probówek BD Trucount™ Tubes pochodzących z różnych serii.
- Probówki BD Trucount™ Tubes zaprojektowano do stosowania w określonej procedurze lizy/bez płukania. Podczas zbierania danych nie należy próbować stosowania wartości progowej rozproszenia do przodu (FSC).
- Kartę charakterystyki można pobrać ze strony regdocs.bd.com/regdocs/sdsSearch.

Przechowywanie i postępowanie

- Przechowywać odczynnik w temperaturze 2–8°C. Odczynnik w otwartych lub nieotwartych fiolkach zachowuje stabilność do daty ważności podanej na etykiecie fiołki. Nie należy go używać po upływie tej daty ważności.
- Podczas przechowywania lub inkubacji komórek nie zamrażać odczynnika i nie narażać go na bezpośrednie działanie światła. Fiolkę z odczynnikiem utrzymywać w stanie suchym.
- Odczynnik jest stabilny, jeśli jest przechowywany w urządzeniu BD FACSDuet™ przez 8 godzin dziennie przez 5 dni. Nie przechowywać odczynnika przez noc w urządzeniu. Wykorzystanie wszelkich odczynników pozostałych po przechowywaniu w urządzeniu BD FACSDuet™ przez 5 dni musi być zweryfikowane przez użytkownika.
- Przechowywać probówki BD Trucount™ Tubes w oryginalnej foliowej torebce w temperaturach 2–25°C. W celu uniknięcia kondensacji torebkę należy otwierać wyłącznie po osiągnięciu temperatury pokojowej. Po wyjęciu probówki należy natychmiast zamknąć torebkę. Nie usuwać środka osuszającego z torebki. Probówki należy użyć w ciągu 1 godziny od wyjęcia z foliowej torebki.
- Probówki BD Trucount™ Tubes w nieotwartej torebce pozostają stabilne do daty ważności podanej na opakowaniu. Nie należy ich używać po upływie daty ważności.
- Probówki w otwartej torebce są stabilne przez 1 miesiąc po dacie otwarcia, jeśli są przechowywane zgodnie z zaleceniami. Zapisać datę pierwszego otwarcia torebki w miejscu przewidzianym na etykiecie.

4. URZĄDZENIE

Systemy BD FACSLytic™ and BD FACSCanto™ II podano w następującej tabeli. Szczegółowe informacje zawiera dokumentacja użytkownika odczynnika lub urządzenia.

Tabela 2 Systemy BD FACSLytic™ and BD FACSCanto™ II

Cytometr przepływowy	Kulki kalibracyjne	Oprogramowanie do ustawiania	Oprogramowanie analityczne	Moduł oznaczenia
BD FACSLytic™	BD® CS&T Beads ^a BD® FC Beads 7-Color Kit ^b	Aplikacja BD FACSuite™ Clinical	Aplikacja BD FACSuite™ Clinical	BD Multitest™ 6-Color
BD FACSCanto™ II	BD FACS™ 7-Color Setup Beads ^c	Oprogramowanie kliniczne BD FACSCanto™ Clinical w wersji 2.4 lub nowszej	Oprogramowanie kliniczne BD FACSCanto™ Clinical w wersji 2.4 lub nowszej	BD Multitest™ 6-Color
<p>a. Do wykonywania codziennej kontroli jakości działania cytometru.</p> <p>b. Do obliczania kompensacji.</p> <p>c. Do ustawienia napięcia fotopowielacza (PMT), kompensacji fluorescencji i sprawdzenia czułości urządzenia przed użyciem.</p>				

Z produktem można używać również podajnika BD FACS™ Loader i BD FACS™ Universal Loader. Więcej informacji można znaleźć w instrukcji obsługi cytometru używanego z podajnikiem.

Z tym produktem można używać również systemu do przygotowywania próbki BD FACSDuet™. Aby uzyskać więcej informacji, patrz *instrukcja użytkownika systemu przygotowania próbki BD FACSDuet™*.

5. POBRANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBK

- Zebrać próbki krwi w sposób aseptyczny przez wenopunkcję do sterylnej probówki do pobierania krwi BD Vacutainer® blood collection tube zawierającej EDTA lub jej odpowiednik³⁵.

Odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK z BD Trucount™ Tubes został zatwierdzony dla ciekłych i suchych form EDTA. Odczynnik nie został zweryfikowany przez firmę BD Biosciences w zakresie stosowania z antykoagulantami zawierającymi heparynę lub roztwór ACD do określania liczb bezwzględnych dla probówek BD Trucount™ Tubes.

Oznaczenie wymaga 50 µl krwi obwodowej na test. Zaleca się rozpoczęcie z minimum 100 µl krwi w celu pomieszczenia nadmiaru objętości potrzebnej do wymagania pipetowania odwrotnego.

- Przy użyciu metody dwóch platform, należy uzyskać liczbę białych krwinek (WBC) i obliczenia różnicowania białych krwinek wykonanego dla tej samej próbki krwi przed wybarwieniem w celu obliczenia wartości bezwzględnych na podstawie udziałów procentowych. Patrz Metoda dwóch platform na stronie 16.
- Przechowywać próbki krwi w temperaturze pokojowej (20–25°C).
- Próbkę należy wybarwić w ciągu 24 godzin od pobrania.
- Zebrać próbki w ciągu 6 godzin od wybarwienia.

OSTRZEŻENIE Wszystkie próbki biologiczne i materiały stykające się z nimi są uznawane za zagrożenie biologiczne. Należy postępować z nimi jak z materiałami mogącymi przenosić zakażenia^{36,37} i utylizować, stosując właściwe środki ostrożności, zgodnie z przepisami krajowymi, regionalnymi i lokalnymi. Nie pipetować ustami. Należy nosić odpowiednią odzież ochronną, okulary i rękawice. Zgodnie z opublikowanym informacjami utrwalanie powoduje dezaktywację wirusa HIV³⁸.

Zakłócenie

Substancje obecne w próbce mogą zakłócać oznaczenie:

- Próbki pobrane od pacjentów przyjmujących leki immunosupresorowe^{39,40,41} lub od osób poddanych terapii przeciwciałami monoklonalnymi^{42,43,44,45,46,47} mogą dać błędne wyniki.
- Próbki zhemolizowane mogą zakłócać oznaczenie i powinny zostać odrzucone⁴⁸. Nie należy używać wcześniej utrwalonych i przechowywanych próbek pobranych od pacjentów. Próbki krwi pełnej zamrożone przed wybarwieniem mogą dać anormalne wyniki.
- Komórki blastyczne mogą zakłócać wyniki testów⁴⁹.
- Próbki lipemiczne mogą zakłócać oznaczenie^{50,51}.
- Bilirubina powoduje zakłócenia w szczycie absorpcji wynoszącym 456 nm⁵².

Warunki zakłócające

W poniższej tabeli wymieniono substancje, które poddano testom pod kątem powodowania zakłóceń w badaniach z wykorzystaniem odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK i opcjonalnie BD Trucount™ Tubes.

Testy na zakłócenia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁵³. Nie było wykrywalnej interferencji przy następujących stężeniach.

Tabela 3 Substancje niezakłócające

Analit	Badane stężenie
Paracetamol	156 µg/ml
Kwas acetylosalicylowy (Aspiryna)	30 µg/ml
Salbutamol	0,015 µg/ml
Atenolol	3 µg/ml

Analit	Badane stężenie
Atorwastatyna	0,25 µg/ml
Azytromycyna	3,7 µg/ml
Bilirubina, sprzężona	2 mg/dl
Kobicystat	3,6 µg/ml
Efawirenz	12 µg/ml
Enoksaparyna	2 µg/ml
Gwajafenezyna	1,5 µg/ml
Hydroksychlorochina	0,2 µg/ml
Ibuprofen	73 µg/ml
Insulina	37 µU/ml
Kaletra	15,5 µg/ml
Lizynopryl	0,082 µg/ml
Marawirok	0,888 µg/ml
Oseltamiwir	0,133 µg/ml
Raltegrawir	15 µg/ml
Remdesiwir	16,32 µg/ml
Rytonawir	15 µg/ml
Tenofowir	0,978 µg/ml
Tocilizumab	149,4 µg/ml
Wankomycyna	40 µg/ml

Następujące substancje powodowały zakłócenia w badaniu w podanym stężeniu:

Tabela 4 Substancje zakłócające

Analit	Badane stężenie
Albumina ^{a,e}	6 g/dl
Bilirubina, niesprężona ^{b,e}	2 mg/dl
Erytrocyty ^{c,e}	6x10 ³ komórek/ μ l
Hemoglobina ^{c,e}	1000 mg/dl
Trójglicerydy ^{d,e}	1500 mg/dl

a. Albumina powoduje zakłócenia na skutek stosunkowo wysokiego stężenia we krwi obwodowej i zdolności wiązania, jak również uwalniania dużych ilości ligandów⁵⁴.
b. Niesprężona bilirubina może powodować autofluorescencję⁵⁵.
c. Obecność czerwonych krwinek (ang. red blood cells, RBC) w preparacie próbki może powodować interferencję światła i nieswoiste interakcje prowadzące do błędnych wyników testu⁵⁶. Próbkę zhemolizowaną należy odrzucić. Stężenie hemoglobiny odnosi się do wolnej hemoglobiny.
d. Leki immunomodulujące stosowane w leczeniu zakażenia wirusem HIV mogą powodować lipemię. Lipemia powoduje zakłócenia w badaniach wykorzystujących przenikanie światła i wpływa na rozproszenie światła^{57,58}.
e. Wymienione substancje endogenne zakłócają oznaczenie w stężeniach wyższych niż prawidłowe, tj. przy hiperalbuminemii, hiperbilirubinemii (bilirubina niesprężona), erytrocytozie, hemoglobinemii i hipertriglicydemii. Zakłócenia powodowane przez te substancje endogenne nie są rzadkie i zostały opisane w literaturze (patrz odniesienia wymienione w przypisach a–d).

6. PROCEDURA

Odczynniki i materiały

Dostarczone odczynniki i materiały

Odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK jest dostarczany w 1 ml buforowanej soli fizjologicznej z < 0,1% azydkiem sodu. Odczynnik wystarcza na 50 testów.

Podczas obliczania liczby bezwzględnej należy użyć odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK z BD Trucount™ Tubes. Odczynnik jest dostarczany w dwóch torebkach z próbkami BD Trucount™ Tubes. Każda torebka zawiera 25 próbek, co wystarcza na 25 testów. Probówki zawierają wysuszony przez wymrażanie osad kulek fluorescencyjnych w próbówce jednorazowego użytku.

Wymagane, ale niedostarczone odczynniki i materiały

- BD FACS™ Lysing Solution (nr katalogowy 349202)
Roztwór do lizy jest dostarczony jako roztwór 10X i zawiera glikol dietylenowy oraz formaldehyd. Patrz instrukcja użycia *BD FACS™ Lysing Solution*, aby zapoznać się ze środkami ostrożności i ostrzeżeniami.
- Jednorazowe testowe próbówki polistyrenowe z korkami 12 × 75 mm lub odpowiednik (jeżeli nie są używane próbówki BD Trucount™ Tubes)
- Wytrząsarka typu vortex
- Mikropipetor z końcówkami
- Dozownik masowy lub pipetor (450 μ l) do dozowania 1X roztworu do lizy BD FACS™ Lysing Solution
- BD Multi-Check™ Control (Numery katalogowe 340911, 340912, 340913)
- BD Multi-Check™ CD4 Low Control (Numery katalogowe 340914, 340915, 340916)
- (Opcjonalnie) BD Trucount™ Controls (nr katalogowy 340335)
- (Opcjonalny) BD FACS™ Universal Loader
- (Opcjonalnie) BD FACS™ Loader (używany na cytometrze przepływowym BD FACSCanto™ II)

Rozcieńczanie roztworu do lizy BD FACS™ Lysing Solution

Koncentrat 10X należy rozcieńczyć w stosunku 1:10 wodą dejonizowaną w temperaturze pokojowej (20–25 °C). Przygotowany roztwór jest stabilny przez 1 miesiąc w przypadku przechowywania w pojemniku szklanym lub wykonanym z polietylenu o wysokiej gęstości (HDPE) w temperaturze pokojowej.

Pipetowanie odwrotne

Dokładne pipetowanie ma kluczowe znaczenie podczas stosowania probówki BD Trucount™ Tube. Zastosować technikę pipetowania odwrotnego, aby dodać próbkę do probówki BD Trucount™ Tube. W celu wykonania pipetowania odwrotnego wcisnąć przycisk do drugiego zatrzymania. Zwolnić przycisk, aby pobrać nadmiar próbki do końcówki. Wcisnąć przycisk do pierwszego zatrzymania, aby wypuścić dokładną objętość próbki, pozostawiając jej nadmiar w końcówce.

Przeprowadzanie kontroli jakości

Przed zebraniem próbki pacjenta, należy uruchomić dwa poziomy procesy materiału kontrolnego (na przykład BD Multi-Check™ Control i BD Multi-Check™ CD4 Low Control)⁵⁹. Materiały kontrolne powinny dostarczyć ustalone wartości dla udziałów procentowych i liczby bezwzględnych dla odpowiednich populacji komórek. Przetwarzać kontrole tak jak próbki pobrane od pacjenta w celu monitorowania wyników całego procesu analitycznego. Wykonywane jest to przynajmniej raz każdego dnia, gdy prowadzone są badania pacjentów.

UWAGA BD Multi-Check™ Control oraz BD Multi-Check™ CD4 Low Control są walidowane jako kontrola procesu na cytometrach przepływowych BD FACSLyric™.

Jeżeli wymagane, użyć BD Trucount™ Controls, aby zweryfikować dokładność pipetowania i wartość liczby kulek probówki BD Trucount™ Tubes.

Barwienie komórek

W przypadku korzystania z systemu BD FACSDuet™ do przygotowania próbek należy zapoznać się z instrukcją użytkowania systemu przygotowania próbki BD FACSDuet™.

1. W przypadku każdej próbki należy wyjąć probówkę i oznaczyć ją odpowiednim identyfikatorem próbki. Do obliczania liczb bezwzględnych i udziałów procentowych limfocytów, należy oznaczyć probówkę BD Trucount™ Tube. Do obliczania tylko udziałów procentowych limfocytów, należy oznaczyć probówkę 12 × 75 mm.

UWAGA W przypadku próbek barwionych w probówkach BD Trucount™ Tubes należy sprawdzić, czy osad kulek BD Trucount™ znajduje się pod metalową siateczką na dnie probówki. Jeżeli tak nie jest, wyrzucić probówkę BD Trucount™ Tube i zastąpić ją inną. Nie przenosić kulek do innej probówki.

2. Odpipetować 20 µl odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK na spód probówki.
W przypadku używania probówki BD Trucount™ Tube, należy odpipetować odczynnik na bok probówki, tuż powyżej metalowej siateczki bez dotykania osadu kulek.
3. Odpipetować 50 µl dobrze wymieszanego materiału kontrolnego lub antykoagulowanej krwi obwodowej na bok probówki.

W przypadku używania probówki BD Trucount™ Tube, należy odpipetować próbkę na bok probówki, tuż powyżej metalowej siateczki bez dotykania osadu kulek.

UWAGA Dokładnie wymieszać kontrole przed ich pipetowaniem. Szczegółowe instrukcje znajdują się w instrukcji użycia BD Multi-Check™ Control lub BD Multi-Check™ CD4 Low Control.

UWAGA Zastosować technikę pipetowania odwrotnego, aby odpipetować próbkę na bok probówki, tuż powyżej ustalacza. Patrz Pipetowanie odwrotne na stronie 8. Unikać rozmazania próbki na boku

próbówki. Jeżeli krew pełna lub materiał kontrolny pozostanie z boku próbówki, nie zostanie wybarwiony odczynnikiem, co może wpłynąć na wyniki.

4. Zamknąć próbówkę korkiem i delikatnie zworteksować ją w celu wymieszania.
5. Inkubować przez 15–30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej (20–25°C).
6. Dodać 450 µl 1X do próbówki BD FACS™ Lysing Solution.
7. Zamknąć próbówkę korkiem i delikatnie zworteksować ją w celu wymieszania.
8. Inkubować przez 15–30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej (20–25°C).

Próbka jest gotowa do analizy w cytometrze przepływowym. Zebrać próbkę w ciągu 6 godzin od wybarwienia; do czasu zebrania przechowywać wybarwioną próbkę w ciemności, w temperaturze pokojowej (20–25°C).

Przeprowadzanie testu na cytometrach przepływowych BD FACSLyric™

Przed rozpoczęciem:

1. Upewnić się, że ustawienia parametrów QC (CQC) i referencyjne lizy/bez płukania nie wygasły.
2. W razie potrzeby dodać partię odczynników do biblioteki.

Więcej informacji zawiera instrukcja obsługi systemu BD FACSLyric™.

3. Wykonywać codzienną Performance QC (PQC) (kontrola jakości działania) za pomocą BD® CS&T Beads.

Więcej informacji zawiera instrukcja obsługi BD® CS&T Beads oraz instrukcja obsługi systemu BD FACSLyric™.

Aby przeprowadzić test:

1. Utworzyć listę roboczą.
 - Utworzyć zadanie Multi-Check™ Control dla każdej uruchomionej kontroli procesu.
 - Utworzyć odpowiednie zadanie oznaczenia dla każdej uruchamianej próbki pacjenta.
2. Wprowadzić informacje do tabeli listy roboczej.
 - W przypadku nieużywania próbówki BD Trucount™ Tubes, należy wpisać liczbę białych krwinek i odsetek limfocytów (odpowiednio WBC (x1000) i limfocyty (%)) lub liczbę limfocytów (limfocyty (x1000)) w odpowiednich kolumnach.

UWAGA Podzielić liczbę białych krwinek lub liczbę limfocytów przez 1000 przed wpisaniem ich do oprogramowania.

- W przypadku próbówki BD Trucount™ Tubes, należy wpisać numer serii dla próbek oraz liczbę kulek, znaną z etykiety woreczka, w odpowiednie kolumny (odpowiednio numer serii Trucount i kulek na paletkę).
3. Uruchomić kontrolę na liście roboczej.
 4. Dokładnie zworteksować każdą próbówkę przy niskiej prędkości bezpośrednio przed jej pozyskaniem⁶⁰.

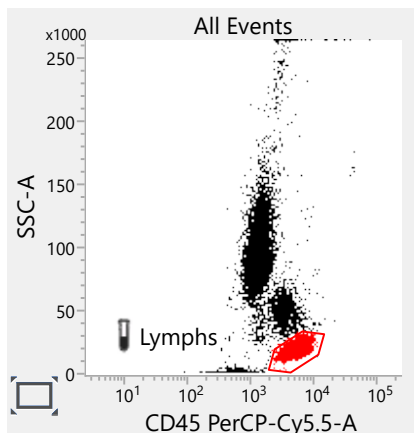
UWAGA W przypadku używania podajnika BD FACS™ Universal Loader zworteksować próbki bezpośrednio przed umieszczeniem ich na statywach podajnika.

5. Po zebraniu próbek kontrolnych kliknąć **Stop Tube** (Zatrzymaj przetwarzanie próbki).

UWAGA Zakłada to, że kontrola procesu przebiega prawidłowo. Zatrzymać, aby sprawdzić, a następnie kontynuować z próbkami stanowiącymi przedmiot zainteresowania. Jeżeli proces kontroli nie powiedzie się, należy ponownie wybarwić próbki i kontroli proces, ponieważ nie można całkowicie odróżnić, czy błąd kontroli procesu wynika z barwienia, czy z urządzenia.

6. Przejrzeć raport laboratoryjny dotyczący kontroli.
7. Sprawdzić wzrokowo wykres kropkowy CD45 PerCP-Cy5.5-A w funkcji SSC-A.

Populacja limfocytów powinna mieć postać jasnej, zwartej grupy przy niskich wartościach SSC. Również monocyty i granulocyty powinny występować jako odrębne grupy. Nie wykonywać analizy, jeżeli populacje są rozproszone i jeżeli nie ma separacji między grupami lub jeżeli jest ona mała.



8. Sprawdzić, czy wyniki mieszczą się w wartościach przedstawionych na arkuszu wartości oznaczenia dostarczonymi wraz z kontrolami.
9. Ustawić wskaźnik przebiegu na pierwszej próbce pacjenta i wybrać **Run from Pointer** (Uruchom od wskaźnika) z menu **Run** (Uruchom).

Przed zebraniem próbek dostosować wartość progu detekcji w celu minimalizacji zanieczyszczeń i uwzględnienia populacji stanowiących przedmiot zainteresowania.

10. Przejrzeć raport oznaczenia laboratoryjnego.

Strona 1 raportu laboratoryjnego pokazuje wykres kropkowy w celu identyfikacji populacji komórek. Przedstawiony raport laboratoryjny dotyczy odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK bez probówek BD Trucount™ Tubes.

BD 6 Color TBNK: Lab Report

Sample ID: 001

Sample Name:

Case Number:

Acquired Using: Worklist_001

Cytometer: BD FACSLytic

Sample Preparer:

Operator: Admin User

Approved: 12/4/2020 3:20:46 PM

Cytometer SN:

Sample Preparer SN:

Director:

Department: None

Entry Status: Approved

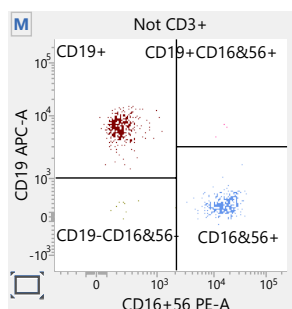
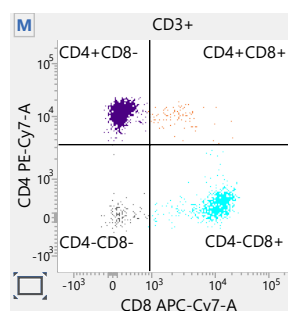
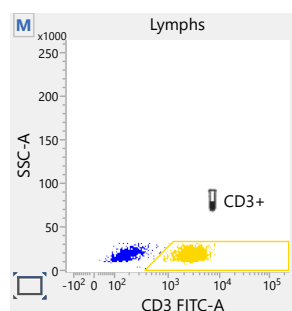
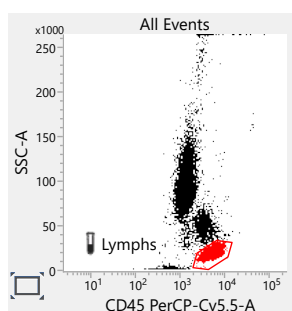
Software: BD FACSuite Clinical

Institution: None

Address:

Tube Name: CD3/16+56/45/4/19/8

Events Acquired	10,000	Acquisition Date	12/4/2020
Reagent Lot ID	Multitest 6-color TBNK Lot ID: 83947	Acquisition Time	2:52:56 PM
Keyword 1	22	Keyword 2	33
WBC (x1000)	7.0	Lymphs (%)	30.0
Lymphs (x1000)	<no value>		



Strona 2 raportu laboratoryjnego podsumowuje wyniki, prezentuje wyniki kontroli jakości dla oznaczenia i prezentuje jakiegokolwiek QC messages (komunikaty kontroli jakości), które zostały wywołane.

Sample ID: CDChex 03280071

Sample Name:

Case Number:

Acquired Using: Worklist_004

Assay: 6 Color TBNK

Results Summary (Abs Cnt is in cells/ μ L)

Label	%Lymphs	Value or Abs Cnt
Lymphs Events		3,211
Lymphs		2,100
CD3+	77.39	1,625
CD3+CD4+	50.83	1,067
CD3+CD4+ (excl. dual pos.)	48.18	1,012
CD3+CD8+	25.97	545
CD3+CD8+ (excl. dual pos.)	23.33	490
CD3+CD4+CD8+	2.65	56
CD3+CD4-CD8-	3.24	68
CD19+	12.36	260
CD3-CD16+CD56+	9.87	207

QC Results

Label	Results
4/8 Ratio	1.96
%T-Sum (<10%)	3.24
Lymphosum (95-105%)	99.63

QC Messages

Showing 0 of 0 QC Messages

Patrz system kliniczny *BD FACSLyric™* — *instrukcja obsługi* lub Clinical Reference System *BD FACSLyric™* (Kliniczny system referencyjny *BD FACSLyric™*), aby dowiedzieć się więcej.

Przeprowadzanie panelu na cytometrach przepływowych BD FACSCanto™ II

1. Uruchomić konfigurację za pomocą kulek BD FACS™ 7-Color Setup Beads.
Aby uzyskać więcej informacji, patrz *instrukcja obsługi BD FACSCanto™ II*.
2. Dodać wpis z panelu BD Multitest™ 6-Color TBNK dla każdej kontroli procesu i próbki pacjenta.
UWAGA W nazwie próbki kontroli procesu musi pojawić się słowo „Kontrola”.
3. Pobrać próbki kontroli procesu.
4. Dokładnie zworteksować każdą probówkę przy niskiej prędkości bezpośrednio przed jej pozyskaniem.
Ważne jest, aby ograniczyć agregację przed badaniem próbek w cytometrze przepływowym.
UWAGA W przypadku używania podajnika BD FACS™ Loader zworteksować próbki bezpośrednio przed umieszczeniem ich na statywach podajnika.
5. Sprawdzić, czy wartości kontroli procesu mieszczą się w oczekiwanych przez producenta zakresach.
6. Pobrać próbki od pacjenta.

7. Przeglądać raport oznaczenia laboratoryjnego.

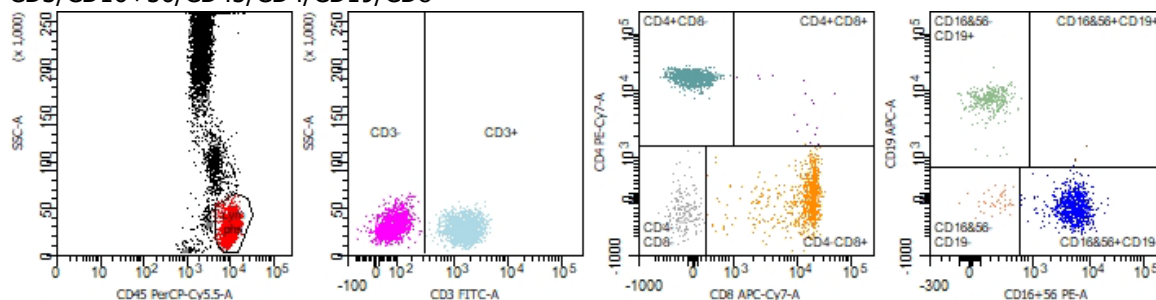
14	
Director:	<div> <div>Panel: 6 Color TBNK</div> <div>Acquired: 10/17/2017 3:05:34 PM</div> <div>Analyzed: 1/4/2018 1:45:18 PM</div> <div>Status: OK</div> <div>Operator: Lab Manager</div> <div>Reviewer:</div> <div>Results: 04012018.csv</div> </div>
WBC Count (x1000):	<div> <div>Lymphs (%):</div> <div>Lymphs (x1000):</div> </div>

BD FACSCanto 1

BD FACSCanto v.3.5.6520.4317

CD3/CD16+56/CD45/CD4/CD19/CD8

Total Events: 10054



14014.001.fcs

Reagent Lot ID: 27602

Parameter	Percent	Value/AbsCnt
Lymph Events		3216
CD3+	62.62	0
CD3+CD8+ (Excl. dual pos.)	24.63	0
CD3+CD4+ (Excl. dual pos.)	32.21	0
CD3+CD4-CD8-	5.29	0
CD3+CD4+CD8+	0.50	0
CD3+CD8+	25.12	0
CD3+CD4+	32.71	0
CD45+		0
4/8 Ratio (Excl. dual pos.)		1.31
4/8 Ratio		1.30
CD16+CD56+	26.21	0
CD19+	9.73	0

QC Messages

% T-Sum is: 4.79

Lymphosum is: 98.57

4/8 ratio is: 1.30

% T-Sum (Excl. dual pos.) is: 5.29

4/8 ratio (Excl. dual pos.) is: 1.31

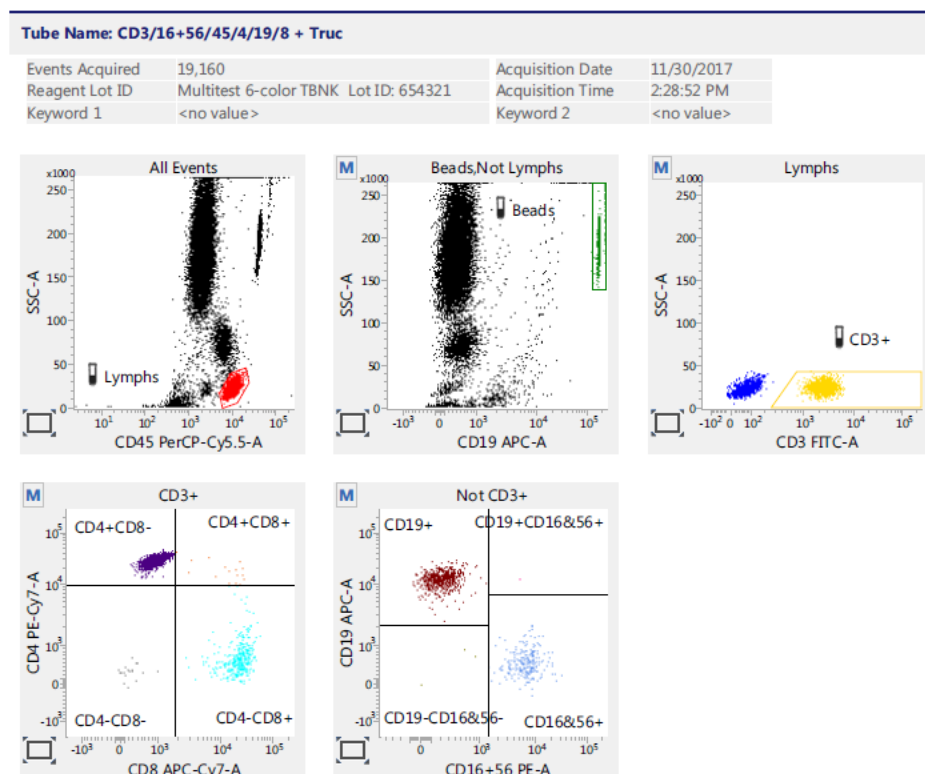
Comments

7. WYNIKI

Dane reprezentatywne

Pochodząca od zdrowego hematologicznie dorosłego pacjenta, wybarwiona za pomocą odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK w próbówce BD Trucount™ Tube, została zebrana przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSLytic™. Patrz rysunek 1.

Rysunek 1 Raport laboratoryjny BD FACSLytic™ przedstawiający dane zebrane przy użyciu próbek BD Trucount™ Tubes

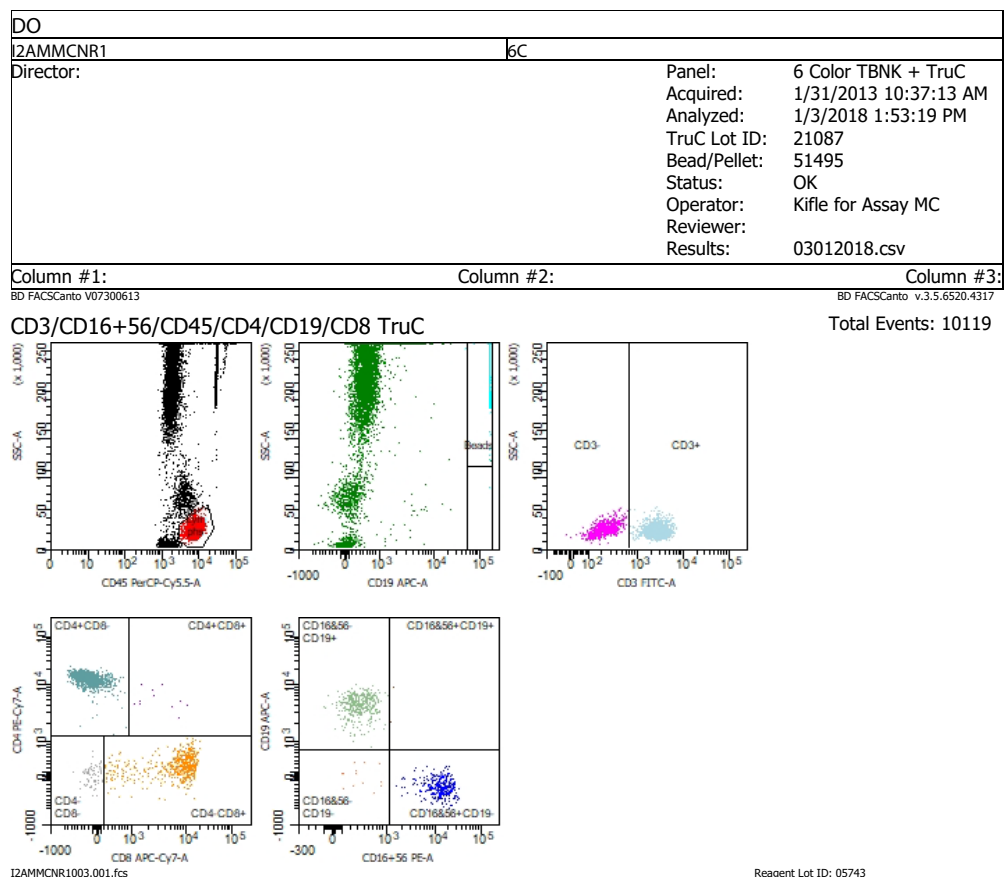


Drugi wykres kropkowy, używany w celu zidentyfikowania kulek Trucount™ beads znajduje się tylko w raporcie laboratoryjnym 6-Color TBNK + Truc.

Dokument *BD FACSLytic™ Clinical Reference System* (Kliniczny system referencyjny BD FACSLytic™) zawiera informacje na temat bramkowania i rozwiązywania problemów.

Podobną próbkę uzyskano na cytometrze przepływowym BD FACSCanto™ II. Patrz rysunek 2.

Rysunek 2 Raport laboratoryjny BD FACSCanto™ II przedstawiający dane zebrane przy użyciu probówek BD Trucount™ Tubes



Subpopulacje limfocytów są identyfikowane przy użyciu następującej strategii bramkowania:

Wykres kropkowy	Populacja macierzysta	Bramka	Zidentyfikowane populacje
CD45 PerCP-Cy5.5-A w funkcji SSC-A	Wszystkie zdarzenia	Limfocyty	Limfocyty
CD19 APC-A w funkcji SSC-A	Kulki, nie limfocyty	Kulki	Kulki Trucount
CD3 FITC-A w funkcji SSC-A	Limfocyty	CD3 ⁺	Limfocyty T CD3 ⁺
CD8 APC-Cy7-A w funkcji CD4 PE-Cy7-A	CD3 ⁺	Ćwiartka	CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
CD16+56 PE-A w funkcji CD19 APC-A	Nie CD3 ⁺ (CD3 ⁻)	Ćwiartka	CD19 ⁺ CD19 ⁺ CD16&56 ⁺ CD16&56 ⁺ CD19 ⁻ CD16&56 ⁻

Obliczanie liczb bezwzględnych

W przypadku użycia specjalnego oprogramowania BD dla cytometru wyniki przedstawiają komórki pozytywne jako odsetek limfocytów. Dodatkowo, oprogramowanie używa jedną lub dwie metod do obliczania liczby bezwzględnej komórek pozytywnych na mikrolitr krwi (komórki/ μ l).

Metoda jednej platformy

Używając probówek BD Trucount™ Tubes, można określić bezwzględną liczbę komórek pozytywnych w próbce, porównując zdarzenia na poziomie komórkowym ze zdarzeniami na poziomie kulek.

Oprogramowanie oblicza liczby bezwzględne przy użyciu następującego wzoru:

$$\frac{\text{liczba zdarzeń w populacji komórek}}{\text{liczba zdarzeń w regionie kulek liczby bezwzględnej}} \times \frac{\text{liczba kulek/test}}{\text{objętość testowa}} = \text{liczba bezwzględna populacji komórek}$$

Liczba kulek/testu jest określona na etykiecie torebki foliowej probówek BD Trucount™ Tubes i może różnić się w zależności od serii.

Metoda dwóch platform

Ta metoda jest używana podczas używania 12 × 75 mm probówek polistyrenowych (lub odpowiednika) zamiast probówek BD Trucount™ Tubes. Podczas tworzenia listy roboczej, należy wpisać wartości dla liczby limfocytów, liczby białych krwinek i odsetka limfocytów, jak określono w analizatorze hematologicznym lub inną metodą. Aby uzyskać więcej informacji, należy zapoznać się z instrukcją obsługi urządzenia.

Oprogramowanie wykorzystuje jeden z następujących wzorów do obliczania liczb bezwzględnych:

- Użytkownik podaje liczbę limfocytów na μ l.

$$\frac{\text{liczba zdarzeń w populacji komórki} \times \text{liczba limfocytów na } \mu\text{l}}{\text{liczba zebranych limfocytów}} = \text{liczba bezwzględna populacji komórek}$$

- Użytkownik podaje liczbę białych krwinek i odsetek limfocytów na μ l.

$$\frac{\text{liczba zdarzeń w populacji komórek} \times \text{liczba białych krwinek} \times (\% \text{limfocytów}/100)}{\text{liczba zebranych limfocytów}} = \text{liczba bezwzględna populacji komórek}$$

UWAGA Dokładność określenia liczb bezwzględnych metodą dwóch platform zależy od dokładności wartości wprowadzonych do oprogramowania.

8. OGRANICZENIA

- Laboratoria muszą ustalić własne standardowe przedziały odniesienia dla zidentyfikowanej subpopulacji limfocytów przy użyciu odczytnika BD Multitest™ 6-Color TBNK. Wiek, płeć, charakterystyki kliniczne i pochodzenie etniczne pacjentów powinny być znane podczas określania zakresu referencyjnego⁶¹. Podane przedziały referencyjne mają charakter wyłącznie informacyjny.

- Odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK nie jest przeznaczony do badań przesiewowych próbek pod kątem obecności komórek białaczkowych lub stosowania w immunofenotypowaniu próbek pochodzących od pacjentów chorych na białaczkę.
- Liczby bezwzględne nie są porównywalne między laboratoriami używającymi sprzętu pochodzącego od różnych wytwórców.
- Odczynnik BD Multitest™ 6-Color TBNK z BD Trucount™ Tubes nie został zweryfikowany przez firmę BD Biosciences w zakresie stosowania z antykoagulantami zawierającymi heparynę lub roztwór ACD do określenia liczb bezwzględnych.

9. PRZEDZIAŁY REFERENCYJNE

Przedziały referencyjne dla odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK z próbkami BD Trucount™ Tubes i bez nich zostały określone w badaniu przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSLytic™⁵⁷. Celem badania było ustalenie wartości przedziału referencyjnego urządzenia w barwionej krwi obwodowej ze zdrowej kohorty dorosłych mężczyzn i kobiet bez nieprawidłowości hematologicznych. Przedział referencyjny urządzenia odnosi się do określonego przedziału rozkładu bezwzględnej liczby podzbiorów limfocytów i wartości procentowych pobranych z biologicznej populacji referencyjnej. Krew z populacji zdrowych osobników kontrolnych została wybarwiona za pomocą odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK z próbkami BD Trucount™ Tubes, a następnie pozyskana i przeanalizowana na cytometrze przepływowym BD FACSLytic™ za pomocą aplikacji BD FACSuite™ Clinical. Aby uzyskać dodatkowe informacje na temat przedziałów odniesienia, patrz pierwsze ograniczenie (podane w poprzedniej części).

Tabela 5 Reprezentatywne przedziały odniesienia dla odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK

Subpopulacja limfocytów	N ^a	Jednostki	Średnia	Zakres 95%
CD3 ⁺	134	%	71,95	57,52–83,11
		komórek/ μ l	1556,40	856–2669
CD3 ⁺ CD4 ⁺	134	%	46,63	31,45–62,38
		komórek/ μ l	1002,75	491–1734
CD3 ⁺ CD8 ⁺	134	%	23,05	9,55–38,32
		komórek/ μ l	505,96	162–1074
CD19 ⁺	134	%	13,84	5,89–24,21
		komórek/ μ l	298,27	73–562
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	134	%	13,56	5,17–30,36
		komórek/ μ l	287,90	108–680

a. N = liczba próbek

10. CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Postępowanie z próbkami i ich pobieranie (AOB/AOS)

Przeprowadzono badanie, aby ocenić wiek krwi (ang. age of blood, AOB) i czas od wybarwienia (ang. age of stain, AOS) przy użyciu BD Multitest™ 6-Color TBNK z próbkami BD Trucount™ Tubes. Stabilność antykoagulowanej krwi EDTA oceniano, oceniając łączny wpływ:

- AOB: Czas między pobraniem próbki a barwieniem
- AOS: Czas między wybarwieniem próbki (koniec lizy) a pozyskaniem zabarwionej próbki

Próbki krwi obwodowej przetestowano w ciągu przynajmniej 27 godzin od pobrania i wybarwione próbki przetestowano w ciągu przynajmniej 8 godzin od wybarwienia. Wszystkie próbki przed wybarwieniem lub zebraniem utrzymywano w temperaturze pokojowej.

Na podstawie wyników tego badania zalecamy wybarwienie próbek w ciągu 24 godzin od zebrania i przeanalizowanie próbek w ciągu 6 godzin od wybarwienia.

Granica ślepej próby i granica wykrywania

Zdolność wykrywania dla odczynników BD Multitest™ 6-Color TBNK na cytometrze przepływowym BD FACSLytic™ została oceniona w jednym ośrodku. Próbki zostały przygotowane ręcznie lub przy użyciu systemu BD FACSDuet™. Granica ślepej próby (LOB) odnosi się do najwyższej wartości pozornej liczby bezwzględnej, która może być wykryta w wybarwionej próbce niezawierającej limfocytów. Granica wykrywania (LOD) odnosi się do najniższej wartości pozornej liczby bezwzględnej, która może być wykryta powyżej zera w wybarwionej próbce zawierającej bardzo niskie stężenie limfocytów CD3⁺CD4⁺.

Próbki osocza niezawierającego komórek zostały użyte do określenia LOB. Próbki osocza zawierające 10 ± 5 CD3⁺CD4⁺ komórek/μl zastosowano do oszacowania LOD. Sześćdziesiąt powtórzeń każdego rodzaju próbki wybarwiono ręcznie lub przy użyciu BD FACSDuet™ z każdą z trzech serii odczynników.

Do pobrania ręcznie przygotowanych próbek wykorzystano trzy cytometry przepływowe BD FACSLytic™. Minimum jeden system zintegrowany BD FACSDuet™ z cytometrem przepływowym BD FACSLytic™ zastosowano w drugim badaniu. Wartości liczby bezwzględnej dla LOB i LOD zostały pokazane w następującej tabeli.

Tabela 6 Zdolność wykrywania odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK (LOB i LOD)

Subpopulacja limfocytów	Ręczne przygotowanie próbki		Przygotowanie próbki z systemem BD FACSDuet™	
	LOB (komórki/μl)	LOD (komórki/μl)	LOB (komórki/μl)	LOD (komórki/μl)
CD3 ⁺	10	12	2	6
CD3 ⁺ CD4 ⁺	2	4	1	4
CD3 ⁺ CD8 ⁺	10	11	2	8
CD19 ⁺	0	1	0	2
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	3	4	0	3

Granica ilościowa

Granica ilościowa (LOQ) dla odczynników BD Multitest™ 6-Color TBNK na cytometrze przepływowym BD FACSLytic™ została oceniona w jednym ośrodku. Próbki zostały przygotowane ręcznie lub przy użyciu systemu BD FACSDuet™. LOQ odnosi się do najniższej wartości liczby bezwzględnej limfocytów, która może być wykryta ilościowo z określoną dokładnością w próbkach zawierających zakres bardzo niskiego stężenia CD3⁺CD4⁺. Próbki osocza zawierające 10, 20, 30 lub 50 CD3⁺CD4⁺ komórek/μl zastosowano do oszacowania LOQ.

W badaniu na cytometrze przepływowym BD FACSLyric™ 40 powtórzeń próbek z każdego z czterech poziomów stężeń wybarwiono przy użyciu dwóch serii odczynników BD Multitest™ 6-Color TBNK. W przypadku systemu porównawczego 10 z 40 powtórzeń z każdego poziomu stężeń wybarwiono i uzyskano na cytometrze przepływowym BD FACSCanto™ II. W badaniu wykorzystano trzy cytometry przepływowe BD FACSLyric™ i jeden cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II.

W badaniu z wykorzystaniem systemu BD FACSDuet™ 10 powtórzeń z każdego poziomu stężenia wybarwiono trzema seriami odczynników przy użyciu systemu BD FACSDuet™ i pozyskano za pomocą zintegrowanego cytometru przepływowego BD FACSLyric™. W przypadku systemu porównawczego pięć powtórzeń z każdego poziomu stężenia wybarwiono ręcznie trzema seriami odczynników i uzyskano na cytometrze przepływowym BD FACSLyric™. W badaniu wykorzystano trzy zintegrowane systemy BD FACSDuet™–BD FACSLyric™ i jeden samodzielny cytometr przepływowy BD FACSLyric™. Wartości liczby bezwzględnej dla LOQ zostały pokazane w następującej tabeli.

Tabela 7 Zdolność wykrywania odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK (LOQ)

	Ręczne przygotowanie próbki (pierwsze badanie)	Przygotowanie próbki z system BD FACSDuet™ (drugie badanie)
Subpopulacja limfocytów	LOQ (komórki/μl)	LOQ (komórki/μl)
CD3 ⁺	17	18
CD3 ⁺ CD4 ⁺	11	9
CD3 ⁺ CD8 ⁺	11	13
CD19 ⁺	5	7
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10	12

Cytometr przepływowy BD FACSLyric™

Porównanie metod, cytometr przepływowy BD FACSLyric™ w porównaniu z cytometrem przepływowym BD FACSCanto™ II

Przeprowadzono badanie w pięciu ośrodkach w celu wykazania równoważności między akwizycją przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSLyric™ i cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II. Próbkę krwi obwodowej zostały pobrane od zdrowych dawców i osób zarażonych wirusem HIV i wybarwione przy użyciu probówek BD Vacutainer® blood collection tubes zawierających EDTA. Próbkę wybarwiono za pomocą odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK w probówkach BD Trucount™ Tubes i zebrano za pomocą cytometru przepływowego BD FACSLyric™ przy użyciu aplikacji BD FACSuite™ Clinical. Odsetek subpopulacji oraz liczba bezwzględna limfocytów została wyliczona. Wyniki porównano z wynikami uzyskanymi dla takich samych próbek zebranych za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II przy użyciu oprogramowania klinicznego BD FACSCanto™ Clinical.

Statystyki porównania metod przedstawiono dla wszystkich subpopulacji komórek⁶². Patrz tabela poniżej.

Tabela 8 Statystyki porównania metod dla subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	N	Jednostki	R ²	Nachylenie	Przecięcie	Zakres
CD3 ⁺	317	%	0,99	0,99	1,43	0,75–94,18
		komórek/ μ l	0,99	1,04	–0,97	4–8013
CD3 ⁺ CD4 ⁺	317	%	1,00	1,00	0,34	0,12–81,18
		komórek/ μ l	1,00	1,04	–0,79	0–4838
CD3 ⁺ CD8 ⁺	317	%	1,00	1,01	0,09	0,20–82,46
		komórek/ μ l	0,99	1,03	0,23	1–5638
CD19 ⁺	317	%	1,00	1,02	–0,29	0–84,8
		komórek/ μ l	1,00	1,01	–0,21	0–4442
CD3 [–] CD16 ⁺ CD56 ⁺	317	%	0,99	0,99	–0,73	0,18–91,87
		komórek/ μ l	0,99	0,94	–0,23	0–1907

Porównanie metod, podajnik BD FACS™ Universal Loader w porównaniu z ręcznym pozyskiwaniem

Badanie przeprowadzono w jednym ośrodku w celu zademonstrowania równoważności pomiędzy zbieraniem przy użyciu podajnika BD FACS™ Universal Loader a ręcznym zbieraniem. Próbkę krwi obwodowej wybarwiono w dwóch powtórzeniach przy użyciu trzech serii BD Multitest™ 6-Color TBNK z próbkami BD Trucount™ Tubes. Zabarwione próbki zostały pobrane na jednym z trzech cytometrów przepływowych BD FACSLyric™ przy użyciu podajnika BD FACS™ Universal Loader lub ręcznego pozyskiwania.

Średnia, różnica i względne różnice wartości dla pozyskiwania przy użyciu podajnika BD FACS™ Universal Loader w porównaniu z ręcznym zbieraniem zostały określone dla odsetków subpopulacji limfocytów i liczby bezwzględnej. Patrz tabela poniżej.

Tabela 9 BD FACS™ Universal Loader w porównaniu z ręcznym zbieraniem

Subpopulacja limfocytów	N	Jednostki	Średnia		Różnica	Różnica względna
			Loader (podajnik)	Ręcznie		
CD3 ⁺	70	%	74,01	74,06	–0,05	–0,04
		komórek/ μ l	1429,51	1471,53	–42,01	–2,63
CD3 ⁺ CD4 ⁺	70	%	29,13	29,20	–0,07	–0,18
		komórek/ μ l	559,81	578,33	–18,51	–2,68
CD3 ⁺ CD8 ⁺	70	%	42,07	41,84	0,23	0,98
		komórek/ μ l	820,44	837,71	–17,27	–1,64
CD19 ⁺	70	%	12,76	12,66	0,10	1,11
		komórek/ μ l	237,21	242,13	–4,91	–1,41

Subpopulacja limfocytów	N	Jednostki	Średnia		Różnica	Różnica względna
			Loader (podajnik)	Ręcznie		
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	70	%	12,26	12,29	-0,04	0,45
		komórek/ μ l	211,71	215,79	-4,07	-2,16

Równoważność oznaczania, BD Multitest™ 6-Color TBNK w porównaniu z obecnością lub brakiem próbek BD Trucount™ Tubes

Badanie przeprowadzono w jednym ośrodku w celu zademonstrowania równoważności pomiędzy odczynnikiem BD Multitest™ 6-Color TBNK z próbkami BD Trucount™ Tubes i bez próbek. Próbkę krwi obwodowej zabarwiono przy użyciu odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK w dwóch powtórzeniach; z jednym powtórzeniem zabarwionym w próbce BD Trucount™ Tube i drugim powtórzeniem zabarwionym w próbce polistyrenowej 12 × 75 mm. Zabarwione próbki zebrano na jednym cytometrze przepływowym BD FACSLytic™. Jedna seria odczynnika BD Multitest™ i trzy serie próbek BD Trucount™ Tubes zostały użyte w tym badaniu.

Określona została średnia udziału procentowego subpopulacji limfocytów z i bez próbek BD Trucount™ Tubes, średnia różnica oraz dolna granica 95% i górna granica 95% przedziału ufności (CI). Patrz tabela poniżej.

Tabela 10 BD Multitest™ 6-Color TBNK z w porównaniu z bez BD Trucount™ Tubes

Subpopulacja limfocytów	N	Średni % limfocytów		Średnia względna lub bezwzględna różnica (%)	Dolna granica 95% przedziału ufności (%)	Górna granica 95% przedziału ufności (%)
		Z Trucount	Bez Trucount			
CD3 ⁺	33	72,87	72,72	-0,16	-0,68	0,36
CD3 ⁺ CD4 ⁺	33	30,60	30,63	1,03	-0,95	3,01
CD3 ⁺ CD8 ⁺	33	38,03	37,92	-0,14	-1,40	1,11
CD19 ⁺	33	12,45	12,26	-0,19	-0,53	0,15
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	33	13,58	13,86	0,28	-0,01	0,57

Porównanie metod, system BD FACSLytic™ w porównaniu z systemem BD FACSDuet™, w porównaniu z niezależnym systemem BD FACSLytic™

Próbki krwi obwodowej pobrano w trzech ośrodkach badań klinicznych. Porcję każdej próbki wybarwiono za pomocą odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK w próbce BD Trucount™ Tube, używając systemu BD FACSDuet™. Zabarwione próbki zostały automatycznie przeniesione do zintegrowanego cytometru przepływowego BD FACSLytic™ i pozyskane za pomocą BD FACS™ Universal Loader oraz aplikacji BD FACSuite™ Clinical. Drugą porcję każdej próbki wybarwiono ręcznie za pomocą BD Multitest™ 6-Color TBNK w próbce BD Trucount™ Tube. Zabarwione próbki pobrano na samodzielnym cytometrze przepływowym BD FACSLytic™ przy użyciu BD FACS™ Universal Loader i aplikacji BD FACSuite™ Clinical.

Wyniki porównano między próbkami przygotowanymi przy użyciu systemu BD FACSDuet™ i próbek przygotowanych ręcznie. Patrz tabela poniżej.

Tabela 11 Statystyki porównania metod dla subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	N	Jednostki	R ²	Nachylenie	Przecięcie	Zakres
CD3 ⁺	370	%	0,98	1,00	-0,31	45,26–99,14
		komórek/ μ l	0,98	1,00	-3,96	89–10,753
CD3 ⁺ CD4 ⁺	370	%	0,99	0,99	0,15	0,27–85,83
		komórek/ μ l	0,99	1,00	-1,19	3–7201
CD3 ⁺ CD8 ⁺	370	%	0,99	1,00	0,17	1,54–86,88
		komórek/ μ l	0,98	1,00	-5,19	50–5083
CD19 ⁺	370	%	0,98	0,99	-0,04	0,13–33,03
		komórek/ μ l	0,98	0,99	-0,45	8–1919
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	370	%	0,98	1,01	0,11	0,5–47,54
		komórek/ μ l	0,98	1,01	2,18	9–2171

Precyzja (powtarzalność), materiał kontrolny (samodzielne cytometry przepływowe BD FACSLytic™)

Przeprowadzono 21-dniowe badanie precyzji w jednym miejscu w celu oceny powtarzalności i precyzji w obrębie miejsca przy użyciu materiału kontrolnego⁶³. Oszacowania precyzji wyliczenia udziałów procentowych i liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów określono dla trzech cytometrów przepływowych BD FACSLytic™ i czterech operatorów, uzyskując dwa stężenia analitu CD-Chex Plus[®] control (CDN) i CD-Chex Plus[®] CD4 Low control (CDL), wybarwione w dwóch powtórzeniach dla czterech serii odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK z próbkami BD Trucount™ Tubes. W ciągu każdego z 21 dni testów wykonano dwie osobne analizy.

W poniższych tabelach przedstawiono odchylenie standardowe (SD) lub współczynnik zmienności (%CV) dla powtarzalności i odpowiednio dla precyzji w obrębie ośrodka udziałów procentowych oraz liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy użyciu materiału kontrolnego.

Tabela 12 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	77,01	0,88	0,90
CD3 ⁺ CD4 ⁺	48,15	1,52	1,83
CD3 ⁺ CD8 ⁺	21,78	0,78	0,80
CD19 ⁺	12,08	0,60	0,60
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,35	0,62	0,63

Tabela 13 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	57,56	1,07	1,09
CD3 ⁺ CD4 ⁺	10,91	0,69	0,73
CD3 ⁺ CD8 ⁺	39,43	1,02	1,05
CD19 ⁺	21,92	0,86	0,87
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	19,36	0,87	0,88

Tabela 14 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/μl)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	1728,97	4,40	4,47
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1081,02	5,17	5,67
CD3 ⁺ CD8 ⁺	488,98	5,91	6,00
CD19 ⁺	271,23	7,19	7,29
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	232,54	7,86	7,95

Tabela 15 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/μl)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	866,44	5,23	5,58
CD3 ⁺ CD4 ⁺	164,18	8,03	8,44
CD3 ⁺ CD8 ⁺	593,38	5,42	5,87
CD19 ⁺	329,94	6,32	6,59
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	291,36	6,82	7,00

Precyzja (powtarzalność), materiał kontrolny (cytometr przepływowy BD FACSLyric™ z systemem BD FACSDuet™)

Przeprowadzono 21-dniowe badanie w jednym ośrodku w celu oceny precyzji w obrębie ośrodka. Dokonano oszacowania precyzji wyliczenia udziałów procentowych i liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów dla trzech systemów BD FACSDuet™, z których każdy był zintegrowany z cytometrem przepływowym BD FACSLyric™ i dla przynajmniej trzech operatorów, uzyskując dwa stężenia analitu CD-Chex Plus control (CDN) i CD-Chex Plus CD4 Low control (CDL), wybarwione w dwóch powtórzeniach dla trzech serii

odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK. W ciągu każdego z 21 dni testów wykonano dwie osobne analizy (łącznie 42 analizy).

W poniższych tabelach przedstawiono odchylenia standardowe (SD) i współczynniki zmienności (%CV) odpowiednio dla powtarzalności i precyzji w obrębie ośrodka i powtarzalności udziałów procentowych oraz liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów.

Tabela 16 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	77,76	0,85	0,85
CD3 ⁺ CD4 ⁺	48,97	0,95	0,96
CD3 ⁺ CD8 ⁺	27,77	0,82	0,95
CD19 ⁺	11,86	0,63	0,64
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	9,88	0,59	0,59

Tabela 17 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	64,11	0,96	0,96
CD3 ⁺ CD4 ⁺	15,02	0,70	0,71
CD3 ⁺ CD8 ⁺	44,16	1,07	1,10
CD19 ⁺	18,31	0,74	0,74
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	16,73	0,77	0,77

Tabela 18 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	1762,40	5,74	7,98
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1109,82	6,97	7,52
CD3 ⁺ CD8 ⁺	630,75	7,77	8,43
CD19 ⁺	268,73	7,34	9,51
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	223,94	7,98	10,28

Tabela 19 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	746,17	3,85	5,30
CD3 ⁺ CD4 ⁺	174,87	6,39	6,57
CD3 ⁺ CD8 ⁺	514,67	5,17	5,53
CD19 ⁺	213,05	5,52	6,39
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	194,76	5,82	6,98

Precyzja (powtarzalność), krew obwodowa (samodzielny cytometr przepływowy BD FACSLytic™)

Przeprowadzono badanie precyzji w jednym ośrodku w celu oceny powtarzalności systemu i precyzji w obrębie ośrodka przy użyciu 44 próbek krwi obwodowej pobranej od zdrowych dawców i osób zarażonych wirusem HIV. Każdą próbkę zabarwiono w dwóch powtórzeniach przy użyciu odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK z BD Trucount™ Tubes, a następnie pobrano i analizowano na dziewięciu cytometrach przepływowych BD FACSLytic™.

W poniższych tabelach przedstawiono odchylenie standardowe (SD) lub współczynnik zmienności (%CV) dla powtarzalności i odpowiednio dla precyzji w obrębie ośrodka udziałów procentowych oraz liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy użyciu krwi obwodowej.

Tabela 20 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	73,55	0,92	0,93
CD3 ⁺ CD4 ⁺	33,42	0,84	0,84
CD3 ⁺ CD8 ⁺	37,54	0,94	0,95
CD19 ⁺	13,23	0,66	0,66
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	12,49	0,68	0,68

Tabela 21 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	1402,64	4,31	4,35
CD3 ⁺ CD4 ⁺	634,13	5,22	5,24
CD3 ⁺ CD8 ⁺	722,11	5,37	5,42
CD19 ⁺	233,55	7,01	7,06
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	218,10	7,54	7,57

Precyzja (powtarzalność), krew obwodowa (cytometr przepływowy BD FACSLytic™ z systemem BD FACSDuet™)

Przeprowadzono badanie precyzji w jednym ośrodku, z użyciem krwi obwodowej od pacjentów zakażonych wirusem HIV i osób zdrowych, w celu oceny powtarzalności i precyzji w obrębie ośrodka, gdy próbki są przygotowywane i pobierane w cytometrze przepływowym BD FACSLytic™ z systemem przygotowania próbki BD FACSDuet™. Każda próbka od dawcy została wybarwiona w dwóch powtórzeniach przy użyciu trzech partii BD Multitest™ 6-Color TBNK w probówkach BD Trucount™ Tubes i poddana analizie na trzech urządzeniach BD FACSDuet™, z których każdy był zintegrowany z cytometrem przepływowym BD FACSLytic™, przeprowadzono łącznie 18 przebiegów na próbkę.

Tabela 22 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	76,74	0,97	0,97
CD3 ⁺ CD4 ⁺	31,34	0,93	0,93
CD3 ⁺ CD8 ⁺	43,94	1,03	1,04
CD19 ⁺	12,07	0,72	0,72
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,71	0,85	0,86

Tabela 23 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	1610,26	4,17	4,32
CD3 ⁺ CD4 ⁺	657,09	4,92	5,03
CD3 ⁺ CD8 ⁺	927,05	5,17	5,35
CD19 ⁺	251,73	7,47	7,47
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	221,73	10,13	10,41

Precyzja (odtwarzalność), materiał kontrolny (niezależny cytometr przepływowy BD FACSLytic™)

Przeprowadzono badanie w czterech ośrodkach w celu oceny odtwarzalności odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK. Do każdego z ośrodków dostarczono jedną partię każdego materiału kontrolnego, CD-Chex Plus® control (CDN) i CD-Chex Plus® CD4 Low (CDL). W przypadku każdego rodzaju materiału kontrolnego zabarwiono trzy powtórzenia za pomocą odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK z probówkami BD Trucount™ Tubes. W ciągu każdego z 5 nie następujących po sobie dni testów wykonano dwa osobne przebiegi.

W poniższych tabelach przedstawiono odchylenie standardowe (SD) lub współczynnik zmienności (%CV) odpowiednio dla odtwarzalności udziałów procentowych oraz liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów.

Tabela 24 Odtwarzalność dla odsetka subpopulacji limfocytów w normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Odchylenie standardowe
CD3 ⁺	76,98	1,02
CD3 ⁺ CD4 ⁺	51,91	1,09
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24,64	1,59
CD19 ⁺	12,21	0,65
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,20	0,75

Tabela 25 Odtwarzalność dla odsetka subpopulacji limfocytów w niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Odchylenie standardowe
CD3 ⁺	57,46	1,14
CD3 ⁺ CD4 ⁺	12,19	0,73
CD3 ⁺ CD8 ⁺	40,47	1,05
CD19 ⁺	21,97	0,84
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	19,31	0,84

Tabela 26 Odtwarzalność dla liczby bezwzględnej subpopulacji limfocytów w normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/μl)	%CV
CD3 ⁺	1742,38	5,48
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1175,19	5,95
CD3 ⁺ CD8 ⁺	557,86	8,32
CD19 ⁺	276,52	7,72
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	231,03	9,48

Tabela 27 Odtwarzalność dla liczby bezwzględnej subpopulacji limfocytów w niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/μl)	%CV
CD3 ⁺	875,81	4,86
CD3 ⁺ CD4 ⁺	185,79	7,28
CD3 ⁺ CD8 ⁺	616,88	5,14
CD19 ⁺	335,03	6,37
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	294,49	6,82

Precyzja (odtwarzalność), materiał kontrolny (cytometr przepływowy BD FACSLyric™ z systemem BD FACSDuet™)

Przeprowadzono badanie w trzech ośrodkach w celu oceny odtwarzalności odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK. Do każdego ośrodka dostarczono pojedynczą partię każdej kontroli procesu, kontroli CD-Chex Plus control (CDN) i CD-Chex Plus CD4 Low control (CDL). Próbki kontrolne wybarwiono przy użyciu trzech serii odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK z jedną serią probówek BD Trucount™ Tubes, używając systemu BD FACSDuet™, automatycznie przeniesiono do zintegrowanego cytometru przepływowego BD FACSLyric™ i pozyskano za pomocą podajnika BD FACS™ Universal Loader. Każdego dnia wykonywano dwa osobne przebiegi. Analizie poddano wyniki uzyskane w ciągu 15 kolejnych dni testowych.

W poniższych tabelach przedstawiono odchylenia standardowe (SD) i współczynniki zmienności (%CV) odpowiednio dla odtwarzalności udziałów procentowych oraz liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów.

Tabela 28 Odtwarzalność dla odsetka subpopulacji limfocytów w normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Odchylenie standardowe
CD3 ⁺	76,20	0,81
CD3 ⁺ CD4 ⁺	49,82	0,93
CD3 ⁺ CD8 ⁺	25,47	0,88
CD19 ⁺	12,23	0,59
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,14	0,59

Tabela 29 Odtwarzalność dla odsetka subpopulacji limfocytów w niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Odchylenie standardowe
CD3 ⁺	57,56	1,04
CD3 ⁺ CD4 ⁺	9,91	0,60
CD3 ⁺ CD8 ⁺	42,97	1,04
CD19 ⁺	21,47	0,84
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	20,17	0,89

Tabela 30 Odtwarzalność dla liczby bezwzględnej subpopulacji limfocytów w normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	%CV
CD3 ⁺	1959,56	6,08
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1281,09	6,23
CD3 ⁺ CD8 ⁺	654,89	6,41
CD19 ⁺	314,41	7,57
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	286,50	8,53

Tabela 31 Odtwarzalność dla liczby bezwzględnej subpopulacji limfocytów w niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	%CV
CD3 ⁺	944,80	6,95
CD3 ⁺ CD4 ⁺	162,68	9,12
CD3 ⁺ CD8 ⁺	705,39	7,04
CD19 ⁺	352,33	7,26
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	331,07	7,99

Liniowość (cytometr przepływowy BD FACSLyric™ z systemem BD FACSDuet™ i bez niego)

Liniowość została oceniona dla cytometru przepływowego BD FACSLyric™, ze zintegrowanym systemem BD FACSDuet™ i bez niego, wykorzystując trzykrotne pomiary 11 równomiernie rozmieszczonych stężeń WBC. Zaobserwowano liniowość subpopulacji limfocytów w następujących zakresach.

Tabela 32 Liniowe zakresy subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	Zakres (komórki/ μ l)	
	BD FACSLyric™	BD FACSLyric™ z BD FACSDuet™
CD3 ⁺	2–5149	5–5282
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0–3085	3–3188
CD3 ⁺ CD8 ⁺	7–3578	2–3268
CD19 ⁺	0–2013	0–2295
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	1–1522	1–1287

Zakres pomiaru (cytometr przepływowy BD FACSLyric™ z systemem BD FACSDuet™ i bez niego)

Wyznaczono analityczny zakres pomiarowy (ang. analytical measurement range, AMR) dla odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK na cytometrze przepływowym BD FACSLyric™. Aby ustalić zakres pomiarowy BD Multitest™ 6-Color TBNK, dane zostały zaczerpnięte z:

- Badania LOQ z wykorzystaniem cytometru przepływowego BD FACSLyric™ z i bez systemu BD FACSDuet™.
- Badania porównawczego metod między BD FACSLyric™ i cytometrami przepływowymi BD FACSCanto™ II.
- Badania porównawczego metod wykorzystujących niezależny cytometr przepływowy BD FACSLyric™ i BD FACSLyric™ z systemem BD FACSDuet™.

Dolny koniec AMR został określony na podstawie wyników badań granicy oceny ilościowej (LoQ), a górny koniec AMR został określony na podstawie wyników badań porównawczych metod.

Tabela 33 AMR podzbiorów limfocytów

Subpopulacja limfocytów	AMR (komórki/ μ l)
CD3 ⁺	18–5000
CD3 ⁺ CD4 ⁺	11–3000
CD3 ⁺ CD8 ⁺	13–3000
CD19 ⁺	7–2000
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	12–1200

Cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II

Porównanie metod, cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II w porównaniu z cytometrem przepływowym BD FACSCanto™

Udziały procentowe subpopulacji oraz liczby bezwzględne limfocytów wyliczono za pomocą odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK w próbkach BD Trucount™ Tubes i przeanalizowano za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II przy użyciu oprogramowania klinicznego BD FACSCanto™ Clinical w wersji 2.1. Wyniki porównano z wynikami uzyskanymi dla takich samych próbek przeanalizowanych za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ przy użyciu oprogramowania klinicznego BD FACSCanto™ Clinical w wersji 2.0.

Próbki krwi obwodowej pobrano losowo w dwu laboratoriach klinicznych. Statystyki metod porównawczych przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 34 Statystyki porównania metod dla udziałów procentowych i liczb bezwzględnych subpopulacji (cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II w porównaniu z cytometrem przepływowym BD FACSCanto™)

Subpopulacja limfocytów	N	Jednostki	R ²	Nachylenie	Przecięcie	Zakres
CD3 ⁺	104	komórek/ μ l	0,976	0,93	60,19	217–3952
		%	0,971	0,99	1,77	50–92
CD3 ⁺ CD4 ⁺	104	komórek/ μ l	0,997	0,94	20,96	6–2079
		%	0,994	1,00	0,47	1–57
CD3 ⁺ CD8 ⁺	104	komórek/ μ l	0,987	0,93	35,43	62–3462
		%	0,989	1,00	0,44	10–82
CD19 ⁺	104	komórek/ μ l	0,980	0,96	4,25	0–820
		%	0,985	1,00	–0,04	0–38
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	104	komórek/ μ l	0,953	0,91	2,30	15–633
		%	0,964	1,00	–0,50	2–33

Równoważność oznaczania, BD Multitest™ 6-Color TBNK w porównaniu z obecnością lub brakiem probówek BD Trucount™ Tubes

Udziały procentowe subpopulacji określono za pomocą odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK bez probówek BD Trucount™ Tubes i przeanalizowano za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II przy użyciu oprogramowania klinicznego BD FACSCanto™ Clinical w wersji 2.4. Wyniki porównano z wynikami uzyskanymi dla tego samego odczynnika z zastosowaniem probówek BD Trucount™ Tubes, przeanalizowanych za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II przy użyciu oprogramowania klinicznego BD FACSCanto™ Clinical w wersji 2.2.

Próbki krwi obwodowej pobrano wewnątrz w firmie BD Biosciences. Statystyki metod porównawczych przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 35 Statystyki porównania metod dla udziałów procentowych i liczb bezwzględnych subpopulacji (z BD Multitest™ 6-Color TBNK z probówkami BD Trucount™ Tubes i bez nich)

Subpopulacja limfocytów	N	Jednostki	R ²	Nachylenie	Przecięcie	Zakres
CD3 ⁺	52	%	0,982	1,012	-0,919	36–87
CD3 ⁺ CD4 ⁺	52	%	0,994	0,996	-0,001	1–61
CD3 ⁺ CD8 ⁺	52	%	0,993	1,006	0,310	11–68
CD19 ⁺	52	%	0,985	0,985	0,039	0–35
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	52	%	0,986	1,034	-0,485	5–40

Precyzja (powtarzalność), materiał kontrolny (cytometry przepływowe BD FACSCanto™ II)

W celu oceny precyzji powtarzalności w obrębie ośrodka przeprowadzono 21-dniowe badanie w jednym ośrodku. Oszacowania precyzji wyliczenia udziałów procentowych i liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów określono dla trzech urządzeń i dla przynajmniej trzech operatorów, uzyskując dwa stężenia analitu CD-Chex Plus control (CDN) i CD-Chex Plus CD4 Low (CDL) control, wybarwione w dwóch powtórzeniach dla jednej serii odczynnika BD Multitest™ z 6-Color TBNK. W ciągu każdego z 21 dni testów wykonano dwie osobne analizy (łącznie 42 analizy).

W poniższych tabelach przedstawiono odchylenia standardowe (SD) i współczynniki zmienności (CV) dla powtarzalności i precyzji w obrębie ośrodka.

Tabela 36 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	73,1	0,82	0,87
CD3 ⁺ CD4 ⁺	46,3	0,76	0,80
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24,0	0,75	0,76
CD19 ⁺	15,3	0,57	0,60
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,6	0,57	0,58

Tabela 37 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	54,1	1,32	1,32
CD3 ⁺ CD4 ⁺	10,2	0,47	0,47
CD3 ⁺ CD8 ⁺	39,3	1,10	1,18
CD19 ⁺	26,0	1,07	1,09
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	18,2	0,78	0,80

Tabela 38 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	2091,5	3,3	3,6
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1326,7	3,6	4,0
CD3 ⁺ CD8 ⁺	686,8	4,5	4,5
CD19 ⁺	439,3	5,4	6,0
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	303,7	5,9	6,3

Tabela 39 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla liczb bezwzględnych subpopulacji limfocytów przy niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (komórki/ μ l)	Powtarzalność (%CV)	Precyzja w obrębie ośrodka (%CV)
CD3 ⁺	1074,5	4,2	4,3
CD3 ⁺ CD4 ⁺	202,6	5,1	5,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺	780,1	4,9	5,1
CD19 ⁺	516,9	5,6	5,6
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	361,1	5,4	5,6

Precyzja bez próbek BD Trucount™ Tubes (cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II)

Dokonano oszacowania precyzji w jednym ośrodku BD Biosciences, analizując dwie próbki w dwóch powtórzeniach przy dwóch różnych poziomach stężenia analitu. Próbkę przeanalizowano na trzech różnych urządzeniach, obsługiwanych przez trzech różnych operatorów (jeden operator i jedno urządzenie każdego dnia). W ciągu każdego z 21 dni testów wykonano dwa osobne przebiegi (łącznie 42 przebiegi). Przed każdym z łącznie 42 przebiegów wykonano kalibrację z zastosowaniem kulek BD FACS™ 7-Color Setup Beads. Przez cały czas badania używano jednej serii odczytnika i jednej serii kalibratora.

W poniższej tabeli przedstawiono odchylenia standardowe (SD) udziałów procentowych subpopulacji dla powtarzalności i precyzji w obrębie urządzenia.

Tabela 40 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy normalnym stężeniu analitu (CDN)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	72,8	0,81	0,90
CD3 ⁺ CD4 ⁺	46,4	0,73	0,93
CD3 ⁺ CD8 ⁺	23,9	0,58	1,12
CD19 ⁺	14,8	0,50	0,50
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,4	0,64	0,66

Tabela 41 Powtarzalność i precyzja w obrębie ośrodka dla udziałów procentowych subpopulacji limfocytów przy niskim stężeniu analitu (CDL)

Subpopulacja limfocytów	Średnia (%)	Powtarzalność (SD)	Precyzja w obrębie ośrodka (SD)
CD3 ⁺	52,4	1,03	1,34
CD3 ⁺ CD4 ⁺	11,0	0,56	0,77
CD3 ⁺ CD8 ⁺	37,3	0,80	1,66
CD19 ⁺	26,1	0,70	0,73
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	19,5	0,72	0,84

Liniowość (cytometr przepływowy BD FACSCanto™ II)

Liniowość oznaczenia przy użyciu odczynnika BD Multitest™ 6-Color TBNK i probówek BD Trucount™ Tubes oceniono dla systemu BD FACSCanto™ II, stosując stężenia białych krwinek wynoszące od 0 do $3,8 \times 10^4$ komórek/ μ l. Zaobserwowano liniowość wyników następującym zakresie.

Tabela 42 Liniowe zakresy subpopulacji limfocytów

Subpopulacja limfocytów	Zakres (komórki/ μ l)
CD3 ⁺	6–7382
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1–4494
CD3 ⁺ CD8 ⁺	2–2922
CD19 ⁺	0–863
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0–435

11. ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Problem	Możliwa przyczyna	Rozwiązanie
Słaba rozdzielczość odróżniania zanieczyszczeń od limfocytów.	Oddziaływanie komórek z innymi komórkami i płytkami krwi.	Przygotować i wybarwić inną próbkę.
	Niedelikatne obchodzenie się z komórkami podczas preparacji.	Sprawdzić żywotność komórek. Wirować komórki z mniejszą prędkością.
	Nieprawidłowe ustawienia urządzenia.	Wykonać prawidłowe procedury konfiguracji urządzenia. Zoptymalizować odpowiednio urządzenie.
Wybarwienie jest słabe lub zanika.	Stężenie komórek na etapie wybarwiania było zbyt wysokie.	Sprawdzić i dopasować stężenie komórek lub objętość próbki. Wybarwić ze świeżą próbką.
	Za mało odczynnika.	Powtórzyć wybarwianie, stosując większą ilość przeciwciała.
	Komórki nie zostały przeanalizowane w ciągu 24 godzin od wybarwienia.	Powtórzyć wybarwianie dla świeżej próbki. Niezwłocznie przeanalizować.
Mało lub brak komórek.	Zbyt niskie stężenie komórek.	Ponownie utworzyć zawiesinę świeżej próbki przy wyższym stężeniu. Powtórzyć wybarwianie i analizę.
	Nieprawidłowe działanie cytometru.	Rozwiązać problem związany z urządzeniem.

PIŚMIENNICTWO

1. Cossarizza A, De Biasi S, Gibellini L, et al. Cytometry, immunology, and HIV infection: three decades of strong interactions. *Cytometry. Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013;83(8):680-691.
2. Hanson IC, Shearer WT. Ruling out HIV infection when testing for severe combined immunodeficiency and other T-cell deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3):875-876.e875.
3. Oliveira JB, Fleischer TA. Molecular- and flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency disorders. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2010;10(6):460-467.
4. Rich RR, Chaplin DD. The Human Immune Response. In: Rich RR, Fleischer TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, eds. *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. London: Content Repository Only; 2019:3-17.e11.
5. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
6. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.

7. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
8. Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Vol 2. New York, NY: Oxford University Press; 1995:1367-1372.
9. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
10. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
11. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
12. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131:212-216.
13. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.
14. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
15. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.
16. Reichert T, DeBruyère M, Deney V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
17. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol*. 1983;130:2133-2141.
18. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol*. 1983;130:2142-2148.
19. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1984;133:180-189.
20. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
21. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991;146:4421-4426.
22. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
23. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*. 1987;236:799-806.
24. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.

-
25. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett.* 1990;10:43-55.
 26. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984;312:763-767.
 27. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* 1986;47:333-348.
 28. Moldenhauer G, Dörken B, Schwartz R, Pezzutto A, Knops J, Hammerling GJ. Analysis of ten B lymphocyte-specific workshop monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes.* New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:61-67.
 29. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
 30. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood.* 1987;70:1316-1324.
 31. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1989;86:10044-10048.
 32. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol.* 1987;139:678-682.
 33. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either Lyt-2 or L3T4. *Eur J Immunol.* 1987;17:643-650.
 34. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol.* 1983;131:1789-1796.
 35. *Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens, 7th ed.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. CLSI document GP41.
 36. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
 37. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html>. Accessed March 12, 2019.
 38. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.
 39. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
 40. Neves I Jr, Morgado MG. Immunological evaluation of human immunodeficiency virus infected individuals by flow cytometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro.* 2000;95(3):393-400.
 41. Giacoia-Gripp CBW, Sales AM, Nery JA, et al. Evaluation of cellular phenotypes implicated in immunopathogenesis and monitoring immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/leprosy cases. *PLoS One.* 2011;6(12):e28735.
 42. Ostrov BE, Amsterdam D. The interference of monoclonal antibodies with laboratory diagnosis: clinical and diagnostic implications. *Immunol Invest.* 2013;42(8):673-690.
 43. Book BK, Agarwal A, Milgrom et al. New crossmatch technique eliminates interference by humanized and chimeric monoclonal antibodies. *Transplant Proc.* 2005;37(2):640-642.
 44. Kaufman A, Herold KC. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25(4):302-306.
 45. Frankel AE, Zuckero SL, Mankin AA, et al. Anti-CD3 recombinant diphtheria immunotoxin therapy of cutaneous T cell lymphoma. *Curr Drug Targets.* 2009; 10(2):104-109.

46. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Rosenberg SA. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 2012;119(12):2709-2720.
47. Mendez LM, Cascino MD, Garg J, Brunetta P. Peripheral blood B cell depletion after Rituximab and complete response in lupus nephritis. *Clin J Amer Soc Neph*. 2018;13(10):1502-1509.
48. Centers for Disease Control. Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4+ T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. *MMWR*. 2003;52:3.
49. Craig FE, Foon MA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111:3941-3967.
50. Kroll MH. Evaluating interference caused by lipemia. *Clin Chemistry*. 2004;50.
51. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(1):57-67.
52. Dimeski G. Interference testing. *Clin Biochem Rev*. 2008;29:S43-48.
53. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. CLSI document EP07-A3.
54. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem*. 1999;36 (Pt 6):704-721. doi:10.1177/000456329903600603
55. Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun*. 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x
56. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS; CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*. 2003;52(RR-2):1-13.
57. Kroll MH. Evaluating interference caused by lipemia. *Clin Chemistry*. 2004;50.
58. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(1):57-67.
59. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
60. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
61. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. CLSI document EP28-A3c.
62. *Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. CLSI document EP09-A3.
63. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurements Procedures; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document EP05-A3.

UWAGA

Tylko UE: użytkownicy powinni zgłaszać wszelkie poważne wypadki związane z wyrobem producentowi i właściwemu organowi krajowemu.

Poza UE: w przypadku jakichkolwiek incydentów lub zapytań związanych z tym wyrobem należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy BD.

Podsumowanie bezpieczeństwa i wydajności można znaleźć w witrynie Eudamed:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

GWARANCJA

Jeżeli nie wskazano inaczej we wszelkich mających zastosowanie warunkach ogólnych firmy BD dotyczących sprzedaży klientom spoza Stanów Zjednoczonych, po zakupie niniejszych produktów obowiązuje poniższa gwarancja.

SPRZEDAWANE PRODUKTY OBJĘTE SĄ GWARANCJĄ WYŁĄCZNIE W ZAKRESIE ZAPEWNIENIA ZGODNOŚCI ILOŚCI I ZAWARTOŚCI WSKAZANEJ NA ETYKIECIE LUB OZNAKOWANIU PRODUKTU W MOMENCIE DOSTAWY DO KLIENTA. NINIEJSZYM FIRMA BD ZRZEKA SIĘ WSZYSTKICH INNYCH GWARANCJI, WYRAŻONYCH LUB DOROZUMIANYCH, WŁĄCZAJĄC W TO GWARANCJĘ WARTOŚCI HANDLOWEJ I PRZYDATNOŚCI DO OKREŚLONEGO CELU ORAZ NIENARUSZANIE PRAW. WYŁĄCZNA ODPOWIEDZIALNOŚĆ FIRMY BD JEST OGRANICZONA DO WYMIANY PRODUKTU LUB ZWROTU KOSZTÓW ZAKUPU. FIRMA BD NIE ODPOWIADA ZA ZNISZCZENIE MIENIA LUB JAKIEKOLWIEK SZKODY PRZYPADKOWE LUB POŚREDNIE, WŁĄCZAJĄC W TO OBRAŻENIA CIAŁA LUB STRATY EKONOMICZNE BĘDĄCE WYNIKIEM UŻYCIA PRODUKTU.

PATENTY I ZNAKI TOWAROWE

Informacje o patentach amerykańskich, które mogą mieć zastosowanie, można znaleźć na stronie bd.com/patents.

BD, logo BD oraz BD FACSDuet, BD FACSLytic, BD FACSuite, BD Multi-Check, BD Multitest, BD Trucount, FACS, FACSCanto i Vacutainer są znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company lub jej podmiotów stowarzyszonych. Wszystkie inne znaki towarowe należą do odpowiednich właścicieli.
© 2023 BD. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Cy[™] to znak towarowy firmy GE Healthcare. Produkt jest objęty prawami własności firmy GE Healthcare i Carnegie Mellon University. Jest wytwarzany i sprzedawany na podstawie licencji firmy GE Healthcare. Licencja dotycząca produktu obejmuje wyłącznie sprzedaż do użytku w diagnostyce in vitro. Licencja nie obejmuje żadnych innych zastosowań. Jeżeli wymagana jest dodatkowa licencja dotycząca zastosowania produktu, której nabywca nie posiada, należy zwrócić materiał, bez otwierania go, na adres BD Biosciences, 155 North McCarthy Boulevard, Milpitas, California 95035, USA. Cena materiału zostanie zwrócona.

HISTORIA

Wersja	Data	Wprowadzone zmiany
23-10834(14)	2022-12	Zaktualizowano w celu spełnienia wymogów rozporządzenia (WE) 2017/746.
23-10834(15)	2023-07	Zaktualizowano adres oficjalnego producenta. Dodano adresy i symbol importerów w UE i Szwajcarii. Zaktualizowano glosariusz symboli.

Glosariusz symboli

Odpowiednie symbole znajdują się na etykiecie produktu.

Symbol	Znaczenie
	Wytwórca
	Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej
	Autoryzowany przedstawiciel w Szwajcarii
	Data produkcji
	Użyć przed datą
	Kod partii
	Numer katalogowy
	Numer seryjny
	Jałowy
	Sterylizowano za pomocą aseptycznych technik przetwarzania
	Sterylizowano za pomocą tlenu etylenu
	Sterylizowano za pomocą napromieniania
	Sterylizowano za pomocą pary lub suchego powietrza
	Nie sterylizować ponownie
	Niejałowy
	Nie używać w przypadku uszkodzonego opakowania i zapoznać się z instrukcją użytkowania
	Jałowy układ odprowadzający płyny
	Jałowy układ odprowadzający płyny (tlenek etylenu)
	Jałowy układ odprowadzający płyny (napromieniowanie)
	Ostrożnie, zawartość krucha
	Przechowywać z dala od światła słonecznego
	Przechowywać w stanie suchym
	Dolna granica temperatury
	Górna granica temperatury
	Ograniczenie temperatury
	Ograniczenie wilgotności
	Zagrożenie biologiczne
	Nie używać ponownie
	Zapoznać się z instrukcją użytkowania lub instrukcją użytkowania w formie elektronicznej
	Uwaga
	Zawiera lub ma w swoim składzie lateks naturalny
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Kontrola negatywna
	Kontrola pozytywna
	Zawartość wystarcza na <n> testów
	Wyłącznie do oceny wydajności diagnostyki in vitro
	Niepirogenne
	Numer pacjenta
	Tę stroną do góry
	Nie układać na sobie

Symbol	Znaczenie
	System pojedynczej bariery jałowej
	Zawiera lub ma w swoim składzie ftalan: kombinacja bis (2-etyloheksylu) (DEHP) i ftalanu benzylu butylu (BBP)
	Zebrać oddzielnie Wskazuje, że wymagana jest selektywna zbiórka odpadów urządzeń elektrycznych i elektronicznych.
	Oznaczenie CE; oznacza europejską zgodność techniczną
	Wyrób do badań przyłóżkowych
	Wyrób do samokontroli
	Dotyczy wyłącznie USA: „Uwaga: prawo federalne ogranicza sprzedaż tego wyrobu wyłącznie przez lub na zlecenie lekarza mającego prawo wykonywania zawodu”.
	Kraj produkcji „CC” powinno zostać zastąpione dwuliterowym lub trzyliterowym kodem kraju.
	Godzina pobrania
	Odciąć
	Oderwać w tym miejscu
	Data pobrania
	Przechowywać z dala od źródeł światła
	Powoduje powstawanie wodoru
	Perforacja
	Numer kolejny początku panelu
	Numer kolejny końca panelu
	Kolejny numer wewnętrzny
	<Nr pudełka>/<Pudełka łącznie>
	Wyrób medyczny
	Zawiera substancje niebezpieczne
	Ukraiński znak zgodności
	Spełnia wymagania FCC według 21 CFR część 15
	Certyfikacja produktu UL dla Stanów Zjednoczonych i Kanady
	Unikatowy identyfikator urządzenia
	Importer
	Etykiętę pacjenta umieścić tylko wewnątrz ramki
	Bezpieczne w środowisku rezonansu magnetycznego
	Warunkowo bezpieczne w środowisku rezonansu magnetycznego
	Niebezpieczne w środowisku rezonansu magnetycznego
	Do użycia z
	Produkt zawiera suchy lateks naturalny
	Wyłącznie na eksport
	Instrumenty

Uwaga: Układ tekstu w symbolach jest określony przez projekt etykiety.

L006715(08) 2023-03

INFORMACJE KONTAKTOWE



**Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences**

155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA



Becton Dickinson Ireland Ltd.

Donore Road, Drogheda
Co. Louth, A92 YW26
Ireland



Becton Dickinson Distribution Center NV

Laagstraat 57
9140 Temse, Belgium



BD Switzerland Sàrl

Route de Crassier 17
Business Park Terre-Bonne
Bâtiment A4
1262 Eysins
Switzerland



Becton Dickinson AG

Binningerstrasse 94
4123 Allschwil
Switzerland

BD Biosciences

European Customer Support

Tel +32.53.720.600
help.biosciences@bd.com

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.

66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited

14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Dział Obsługi Technicznej: należy skontaktować się
z lokalnym przedstawicielem BD lub odwiedzić stronę
bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com



eifu.bd.com