



# Instrukcja użycia

Identyfikacja odczynnika IVD

## CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700

**REF**

CS068407

**IVD**

**CE**

Karta charakterystyki tego produktu jest dostępna pod adresem [www.sysmex-partec.com/services](http://www.sysmex-partec.com/services).

## Spis treści

1	Specyfikacja.....	3
2	Przeznaczenie.....	3
3	Zasada metody testowej.....	3
4	Przechowywanie i okres ważności po pierwszym otwarciu .....	3
5	Komponenty .....	4
6	Oznaki pogorszenia jakości .....	4
7	Środki ostrożności i ostrzeżenia .....	4
8	Dodatkowe wymagane wyposażenie .....	4
9	Przygotowanie odczynników .....	5
10	Utylizacja.....	5
11	Pobieranie, obróbka i przechowywanie próbek pierwotnych .....	5
12	Procedura testowa .....	5
12.1	Barwienie .....	5
12.2	Analiza próbki.....	6
12.2.1	Wewnętrzna kontrola jakości .....	6
12.2.2	Cytometria przepływowa .....	6
12.3	Gromadzenie i analiza danych.....	6
13	Interpretacja wyników.....	6
14	Procedura kontrolna .....	7
15	Charakterystyka wydajności testu .....	7
15.1	Swoistość analityczna .....	7
15.2	Czułość analityczna .....	7
15.3	Dane reprezentatywne .....	7
16	Ograniczenia.....	7
17	Piśmiennictwo .....	8
18	Kontakt .....	9
19	Numer wersji IFU i data wydania .....	9
20	Symbolika .....	9

## 1 Specyfikacja

Swoistość	ludzki CD19
Fluorochrom	Alexa Fluor™ 700
Klon	LT19
Gospodarz / Izotyp	Mysz / IgG1
Zawartość	100 testów, 1 mL
Stosowanie	10 µL na test

## 2 Przeznaczenie

**IVD**

**Do stosowania w diagnostyce in vitro.**

Przeciwciało monoklonalne CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700 jest przeznaczone do jakościowej diagnostyki in vitro w celu identyfikacji komórek przedstawiających ludzki antygen CD19 w antykoagulowanej krwi za pomocą przepływowej analizy cytometrycznej. Przeciwciało monoklonalne CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700 jest przeznaczone do stosowania przez przeszkolonych pracowników laboratoriów i służby zdrowia w szpitalach i laboratoriach klinicznych, zarówno do ręcznego, jak i automatycznego przygotowywania próbek. Przeciwciało monoklonalne CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700 może być stosowane do wspomagania diagnozy i klasyfikacji chorób u pacjentów przez laboratoria kliniczne.

## 3 Zasada metody testowej

Metoda ta opiera się na swoistym wiązaniu przeciwciała monoklonalnego z antygenem docelowym ulegającym ekspresji na powierzchni komórki lub wewnątrzkomórkowym przedziale komórkowym. Swoiste przeciwciało monoklonalne związane z antygenem jest sprzężone z fluorochromem, który jest wzbudzany przez odpowiednią wiązkę laserową w odpowiednio wyposażonym cytometrze przepływowym. Późniejsza emisja światła z danego fluorochromu jest zbierana i analizowana przez cytometr przepływowy w dedykowanym detektorze fluorescencyjnym. Różnice w natężeniu fluorescencji komórkowej umożliwiają rozdzielenie subpopulacji komórek na podstawie ekspresji analizowanego antygenu.

Barwienie komórek z ekspresją docelowego antygenu uzyskuje się poprzez inkubację zawiesiny komórek odczynnikiem zawierającym przeciwciało monoklonalne, a następnie, w stosownych przypadkach, poprzez liżę krwinek czerwonych i płukanie komórek w celu usunięcia niezwiązanego odczynnika zawierającego przeciwciało monoklonalne. Zabarwione komórki poddaje się analizie w cytometrze przepływowym.

## 4 Przechowywanie i okres ważności po pierwszym otwarciu

### 1. Przechowywanie:

Odczynnik należy przechowywać w temperaturze 2-8°C w ciemności. Nie zamrażać ani nie wystawiać na działanie światła. Nie używać po upływie terminu ważności podanego na etykiecie.

### 2. Okres ważności po pierwszym otwarciu:

Po otwarciu unikać narażenia odczynnika na bezpośrednie działanie światła lub mrozu. Przechowywać w temperaturze 2-8°C w ciemności. Zamknąć szczelnie pokrywę, aby uniknąć rozlania się płynów i utrzymać fiolkę wolną od wilgoci.

Przeciwciało monoklonalne CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700 zachowuje właściwości użytkowe po wprowadzeniu do użytku przez co najmniej 545 dni.

## 5 Komponenty

Mysie przeciwciało monoklonalne (klon LT19, izotyp IgG1) skierowane przeciwko ludzkiemu antygenowi CD19, znakowane fluorochromem Alexa Fluor™ 700.

Odczynnik jest dostarczany w stabilizującym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS), pH  $\approx$  7,4, zawierającym 0,09% (wag./obj.) azydku sodu i 0,2% (wag./obj.) BSA.

## 6 Oznaki pogorszenia jakości

Unikać zanieczyszczenia odczynników. W przypadku pogorszenia jakości komponentów, postrzeganego jako widoczne wytrącenie lub przebarwienia odczynnika, lub jeśli uzyskane dane wskazują na jakiegokolwiek zmiany wydajności, należy skontaktować się z Działem Obsługi Technicznej lokalnego przedstawiciela Sysmex.

Jakikolwiek problem, który wystąpił w związku z produktem, użytkownik powinien zgłosić producentowi. W przypadku poważnych incydentów prosimy o kontakt z producentem oraz właściwymi władzami.

## 7 Środki ostrożności i ostrzeżenia

Odczynnik zawiera azydek sodu ( $\text{NaN}_3$ ), który jest bardzo toksyczny w czystej postaci. Stężenie w odczynniku nie jest jednak niebezpieczne. Podczas utylizacji odczynnika należy przestrzegać obowiązujących lokalnych przepisów.

Ważne informacje dotyczące bezpiecznego obchodzenia się, transportu i usuwania tego produktu zawarte są w Karcie Charakterystyki.

Zawsze należy przestrzegać krajowych i międzynarodowych wytycznych i norm regulacyjnych dotyczących środków ochrony indywidualnej.

## 8 Dodatkowe wymagane wyposażenie

Wymagane instrumenty: Cytometr przepływowy wyposażony w odpowiednie źródło światła, filtry i detektory w celu wykrycia rozproszenia światła i odpowiedniej fluorescencji, oraz wyposażony w odpowiednie oprogramowanie analityczne do gromadzenia i analizy danych.

Wytrząsarka typu Vortex

Wirówka (z systemem wirników przeznaczonych do max. 500 g)

Opcja: system do przygotowywania próbek (np. Sysmex Sample Preparation System PS-10)

Potrzebne materiały: Materiały potrzebne do pobrania krwi pełnej

Jednorazowe probówki do barwienia próbek krwi

Pipety z jednorazowymi końcówkami na 10, 100 i 1000  $\mu\text{l}$

Odpowiednie środki ochrony indywidualnej

Dostępny w handlu roztwór do lizy, na przykład: CyLyse™ LV, nr zam.: BL215283 (CE IVD)

Roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS), pH 7,4

Roztwór utrwalający, na przykład: 2% roztwór paraformaldehydu w PBS

## 9 Przygotowanie odczynników

Odczynnik jest gotowy do użycia. Zawartość fiołki (1 ml) wystarcza na 100 testów.

## 10 Utylizacja

Wszystkie materiały jednorazowego użytku, które miały kontakt z materiałami niebezpiecznymi biologicznie, muszą zostać odkażone i usunięte zgodnie z lokalnymi przepisami ustawowymi i wykonawczymi. Natychmiast oczyścić i zdezynfekować zanieczyszczone powierzchnie, zastosować odpowiednie procedury odkażania. Zawsze należy usuwać próbki krwi, testy i płyny pomocnicze po upływie maksymalnego czasu przechowywania.

## 11 Pobieranie, obróbka i przechowywanie próbek pierwotnych

### Ostrzeżenie

*Wszystkie próbki biologiczne i materiały, które mają z nimi kontakt, należy traktować jako stwarzające zagrożenie biologicznie. Probki należy traktować jako potencjalnie zakaźne i usuwać zgodnie z przepisami federalnymi, stanowymi i lokalnymi.*

Krew pełną należy pobierać do sterylnej probówki z antykoagulantem. Probówkę z próbką krwi należy przechowywać w temperaturze pokojowej (18-28 °C). Delikatnie wymieszać przed użyciem. W celu uzyskania najlepszych wyników zaleca się stosowanie świeżej próbki krwi. Czas między pobraniem a analizą nie powinien być dłuższy niż 24 godziny.

## 12 Procedura testowa

### 12.1 Barwienie

1. Dodać 10 µl odczynnika CyFlow™ zawierającego przeciwciało monoklonalne do probówki.
2. Dodać 100 µl próbki krwi do probówki i delikatnie wymieszać wytrząsarką Vortex.
3. Inkubować przez 20-30 minut w temperaturze pokojowej (18-28 °C) w ciemności.
4. Przeprowadzić lizę krwinek czerwonych. Przestrzegać instrukcji podanej przez producenta roztworu do lizy. Na przykład w przypadku używania CyLyse™ LV należy dodać 2 ml rozcieńczonego 10X roztworu do lizy CyLyse™ LV na 100 µl krwi pełnej i delikatnie wymieszać wytrząsarką Vortex.
5. Inkubować przez 10-15 minut w temperaturze pokojowej (18-28 °C) w ciemności.
6. Odwirowywać probówki przez 5 minut przy 300 g i usunąć supernatant przez dekantację.
7. Zawiesić ponownie osad komórkowy przy użyciu 2 ml PBS.
8. Odwirowywać probówki przez 5 minut przy 300 g i usunąć supernatant przez dekantację.
9. W celu późniejszej analizy w cytometrze przepływowym ponownie zawiesić osad komórek w odpowiedniej objętości PBS dostosowanej do cytometru przepływowego.
10. W celu późniejszej analizy zawiesza się komórki w roztworze utrwalającym. Zaleca się stosowanie 2% roztworu paraformaldehydu w PBS. Probkę należy przechowywać w temperaturze

2-8 °C, bez dostępu światła i analizować w ciągu 24 godzin.

11. Wymieszać próbki ostrożnie i dokładnie wytrząsarką Vortex, aby zmniejszyć agregację komórek przed analizą metodą cytometrii przepływowej.

## 12.2 Analiza próbki

### 12.2.1 Wewnętrzna kontrola jakości

W celu uzyskania precyzyjnych i powtarzalnych pomiarów zaleca się centrowanie laserowe i regularną kalibrację instrumentów z wykorzystaniem cząsteczek fluorescencyjnych. Każde laboratorium powinno przeprowadzać kontrolę jakości instrumentu zgodnie z instrukcją podaną przez dostawcę instrumentu.

### 12.2.2 Cytometria przepływowa

Próbki należy analizować przy użyciu cytometru przepływowego o odpowiedniej konfiguracji. W celu uniknięcia nieprawidłowych wyników, przed analizą próbki należy zminimalizować zanieczyszczenia i upewnić się, że interesujące populacje są starannie wyznaczone.

## 12.3 Gromadzenie i analiza danych

Dane należy zgromadzić i przeanalizować przy użyciu cytometru przepływowego o odpowiedniej konfiguracji.

Należy zawsze mierzyć parametry rozproszenia światła komórkowego: rozproszenie w osi wiązki (FSC) i rozproszenie boczne (SSC).

Należy zapoznać się z podaną przez producenta specyfikacją cytometru dotyczącą detektorów fluorescencyjnych, w których gromadzone są zdarzenia emisji fluorescencji przeciwciał barwionych CD19+ zgodnie z charakterystyką emisji fluorochromu.

Widma emisji niektórych fluorochromów nakładają się na siebie. Kompensacja mierzonych danych może być wymagana przed analizą.

Dane reprezentatywne CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700 wykonane dla krwi pełnej i bramkowane na limfocytach są przedstawione na ryc. 1.



Ryc. 1: Dane reprezentatywne CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700, przeanalizowane cytometrem przepływowym wyposażonym w laser czerwony (wzbudzenie laserowe 638 nm).

## 13 Interpretacja wyników

W niektórych chorobach spodziewana jest nieprawidłowa liczba komórek z ekspresją tego antygenu lub nieprawidłowe poziomy ekspresji antygenu. Do przeprowadzenia właściwej analizy ważne jest zrozumienie wzorca prawidłowej ekspresji dla badanego antygenu i jego związku z ekspresją innych istotnych antygenów.

## 14 Procedura kontrolna

Firma Sysmex Partec GmbH zaleca codzienne wykonywanie analizy próbki kontrolnej krwi od osoby dorosłej (zdrowego dawcy) lub dostępnej w handlu kontroli krwi pełnej w celu optymalizacji ustawień cytometru przepływowego oraz jako kontrolę jakości systemu.

## 15 Charakterystyka wydajności testu

### 15.1 Swoistość analityczna

Przeciwciało monoklonalne LT19 zostało przypisane podczas International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens do ludzkiego antygenu CD19.

HCDM/HLDA 10

### 15.2 Czulość analityczna

Czulość analityczna dla odczynnika do jakościowej cytometrii przepływowej polega na zdolności do oddzielania dodatnich (+) komórek od ujemnego (-) tła i została oceniona poprzez miareczkowanie odczynnika zawierającego przeciwciało.

Stężenie CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700 w butelce (50 µg/ml) jest wystarczające, aby umożliwić oddzielenie komórek dodatnich od tła w próbce z prawidłową lub nieprawidłową ekspresją antygenu oczekiwaną w pewnych stanach patologicznych.

### 15.3 Dane reprezentatywne

Aby określić wydajność barwienia odczynnikiem CyFlow™ CD19 Alexa Fluor™ 700, procent komórek dodatnich CD19, bramkowanych na limfocytach, został oznaczony przy użyciu pięciu próbek krwi, od zdrowych dawców, barwionych dwoma seriami odczynników w pięciu powtórzeniach na serię i próbkę.

CD19+ komórki (bramkowanych na limfocytach)					
	próbka #1	próbka #2	próbka #3	próbka #4	próbka #5
średnia (%)	10.41	12.37	4.30	8.13	5.33
SD	0.64	0.38	0.43	0.5	0.32
CV (%)	6.12	3.07	9.92	6.14	5.94

Tabela 1: Podsumowanie uzyskanych wyników

## 16 Ograniczenia

Test przeznaczony jest dla użytkowników należących do fachowego personelu medycznego w laboratoriach klinicznych wykonujących analizę metodą cytometrii przepływowej.

Pojedynczy odczynnik zawierający przeciwciało może dostarczyć tylko ograniczone informacje diagnostyczne. Stosowanie kombinacji odczynników może dostarczyć więcej informacji niż stosowanie odczynników indywidualnie, a analiza wielokolorowa przy użyciu odpowiednich kombinacji odczynników jest wysoce zalecana. Laboratoria powinny zidentyfikować kombinacje odczynników, które najlepiej odpowiadają ich potrzebom, w oparciu o właściwości każdego pojedynczego odczynnika zawierającego przeciwciała oraz obecność markerów w próbkach

prawidłowych i nieprawidłowych. Takie kombinacje odczynników powinny być następnie zatwierdzone przez laboratorium w oparciu o to zastosowanie i zamierzone zastosowanie.

Próbki krwi od osób, które nie są zdrowe, mogą wykazywać nieprawidłowe wartości komórek dodatnich.

Hemoliza może wskazywać na niewłaściwe warunki przechowywania, które mogą mieć wpływ na działanie produktu pod względem zdolności do lizy. Dlatego należy wykluczyć próbki hemolizowane.

W przypadku hiperleukocytozy zaleca się rozcieńczyć próbki krwi przy użyciu PBS do stężenia  $5 \times 10^6$  leukocytów/ml.

Krwinki czerwone od pacjentów z zaburzeniami (np. pacjentów z policytemią) mogą być odporne na lizę przy użyciu roztworów do lizy.

Dane dotyczące wydajności odczynnika zostały zgromadzone przy użyciu krwi poddanej działaniu K3 EDTA. Inne antykoagulanty mogą wpływać na wydajność odczynnika.

Cytometr przepływowy może dawać fałszywe wyniki, jeśli urządzenie nie zostało odpowiednio wycentrowane i konserwowane.

*Sysmex Partec GmbH* zaleca stosowanie procedury Lyse/Wash. Procedurę Lyse/No-wash należy stosować z ostrożnością i tylko wtedy, gdy przeciwciała monoklonalne zostało zatwierdzone do zamierzonego badania.

Dane mogą być błędnie interpretowane, jeśli sygnały fluorescencyjne zostały źle skompensowane lub jeśli bramki zostały ustawione nieprawidłowo.

Produkt oznaczony jako CE IVD jest przeznaczony do zastosowań diagnostycznych in vitro w laboratoriach poza USA.

## 17 Piśmiennictwo

- Fujimoto M, Poe JC, Jansen PJ, Sato S, Tedder TF: CD19 amplifies B lymphocyte signal transduction by regulating Src-family protein tyrosine kinase activation. *J Immunol.* 1999 Jun 15; 162(12):7088-94. < PMID: 10358152 >
- Inabe K, Kurosaki T: Tyrosine phosphorylation of B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase is required for Akt activation in response to CD19 engagement. *Blood.* 2002 Jan 15; 99(2):584-9. < PMID: 11781242 >
- Elias F, Flo J, Lopez RA, Zorzopulos J, Montaner A, Rodriguez JM: Strong cytosine-guanosine-independent immunostimulation in humans and other primates by synthetic oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT motifs. *J Immunol.* 2003 Oct 1; 171(7):3697-704. < PMID: 14500668 >
- Lin CW, Liu TY, Chen SU, Wang KT, Medeiros LJ, Hsu SM: CD94 1A transcripts characterize lymphoblastic lymphoma/leukemia of immature natural killer cell origin with distinct clinical features. *Blood.* 2005 Nov 15; 106(10):3567-74. < PMID: 16046525 >
- van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJ, van Tol MJ, Woellner C, Grimbacher B, Patiño PJ, van Dongen JJ, Franco JL: An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med.* 2006 May 4; 354(18):1901-12. < PMID: 16672701 >
- Shi X, Xie C, Chang S, Zhou XJ, Tedder T, Mohan C: CD19 hyperexpression augments Sle1-induced humoral autoimmunity but not clinical nephritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Sep; 56(9):3057-69. < PMID: 17763445 >
- Stehlíková O, Chovancová J, Tichý B, Krejčí M, Brychtová Y, Panovská A, Francová Skuhrová H, Burčková K, Borský M, Loja T, Mayer J, Pospíšilová S, Doubek M: Detecting minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia using 8-color flow cytometry protocol in routine hematological practice. *Int J Lab Hematol.* 2014 Apr; 36(2):165-71. < PMID: 24028768 >



## 18 Kontakt

### Producent



Sysmex Partec GmbH  
Arndtstraße 11 a-b  
02826 Görlitz, Niemcy  
www.sysmex-partec.com

Tel +49 3581 8746 0  
Fax +49 3581 8746 70  
E-mail: info@sysmex-partec.com

## 19 Numer wersji IFU i data wydania

Rewizja : Rew.4\_2022-12-2  
Wydane przez : Sysmex Partec GmbH

## 20 Symbolika

	Numer referencyjny		Data ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Zawiera wystarczającą ilość dla <n> testów
	Oznakowanie CE		Kod partii
	Klon komórek hybrydoma stosowany do wytwarzania przeciwciała monoklonalnego		Limit temperatury
	Producent		Chronić przed światłem słonecznym
	Ostrożnie		Sprawdź instrukcje użytkowania
	Unikalny identyfikator urządzenia		Oznakowanie UKCA
	Oświadczenie dla różnych krajów Ameryki Łacińskiej		

Niniejszy produkt jest dostarczany na podstawie licencji własności intelektualnej Life Technologies Corporation, która zezwala na korzystanie z takiej własności intelektualnej w związku z zakupionym produktem wyłącznie w celu zapewnienia badań medycznych lub diagnostycznych, analiz lub badań przesiewowych, w tym wykorzystania w celu wytyczania strategii terapeutycznej lub określania wyników lub dostarczania informacji klinicznych lub analiz klinicznych w zamian za rekompensatę za każdy test, w ramach parametrów określonych w załączonej dokumentacji dotyczącej produktu. Przekazanie tego produktu jest uwarunkowane tym, że kupujący nie będzie używał tego produktu do celów terapeutycznych lub profilaktycznych, do produkcji innego produktu lub do jakiegokolwiek innego celu, który nie jest wyraźnie dozwolony. W celu uzyskania informacji na temat zakupu licencji na ten produkt do celów innych niż opisane powyżej należy skontaktować się z Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA lub outlicensing@lifetech.com.