

Porovnanie fenotypizácie subpopulácií lymfocytov

pomocou

reagencií TetraChrome a DuraClone IM Phenotyping Basic Tube

Mgr. Gajdošík T., Mgr. Ballová P., Alpha medical a.s. Bratislava,
RNDr. Bobovčák M., Beckman Coulter LS Bratislava

CIEĽ ŠTÚDIE

**Porovnanie výsledkov fenotypizácie základných subpopulácií lymfocytov
dvoma rôznymi metódami.**

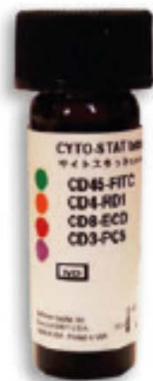
- 1. Metóda: TetraCHROME (CD45/CD56/CD19/CD3) + protilátky CD16, CD4, CD8, IVD CE
- 2. Metóda: DuraClone IM Phenotyping BASIC Tube, RUO

POROVNANIE METÓD - ROZDIELY

1. TETRACHROME + ĎALŠIE PROTILÁTKY - 6 COLOR ANALÝZA

REAGENCIE

- 6607073: TetraCHROME CD45-FITC/CD56- PE/CD19-ECD/CD3-PC5, 50t, IVD&CE
- A07766: CD16-RPE 100t, CE
- A94682: CD4-APC-Alexa Fluor® 750, 50 Tests, CE
- 737661: CD8 PC7 100t, CE
- A09777: VersaLyse 100t CE



POSTUP

- 50 ul plnej EDTA krvi + á 5ul protilátok, vortex
- Inkubácia 15 min, RT, tma
- 500ul Versalyse, vortex ,
- Inkubácia 15 min, RT, tma
- Analýza na cytometri, minimálne 5000 lymfo

Kvapalnú protilátku, 6 - color analýza (Navios 2/8)



POROVNANIE METÓD - ROZDIELY

2. DURACLONE IM PHENOTYPING BASIC TUBE 8 COLOR ANALÝZA

REAGENCIE

B53309: DuraClone IM Phenotyping BASIC Tube, 25 tests, RUO

B36291: HLA-DR-Pacific Blue, 50 tests, CE-IVD



POSTUP

Duraclone ready to use (+ 10ul HLA-DR – PB)

50 ul plnej EDTA krvi do Duraclone skúmavky

Vortex !, Inkubácia 15 min, RT, tma

1000ul Versalyse, vortex ,

Inkubácia 15 min, RT, tma

Analýza na cytometri, minimálne 5000 lymfo

Dry (sušené) protilátky, 8 (9) - color analýza (Navios 3/10)

POROVNANIE METÓD - ROZDIELY

| | | | | | | | | | | |
|---|------|------|------|-------|------|-----|---------------------|-------------------------|---------------|--------------|
| DuraClone IM Phenotyping Basic Tube RUO - 25 tests | FITC | PE | ECD | PC5.5 | PC7 | APC | A700 ⁽¹⁾ | APC-A750 ⁽³⁾ | Pacific Blue* | Krome Orange |
| | CD16 | CD56 | CD19 | - | CD14 | CD4 | CD8 | CD3 | - | CD45 |

| | | | | | | |
|----------------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|
| Kvapalný koktail TetraCHROME + 3 | CD45 | CD56 | CD56 | CD3 | CD8 | CD4 |
|----------------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|

HLA-DR



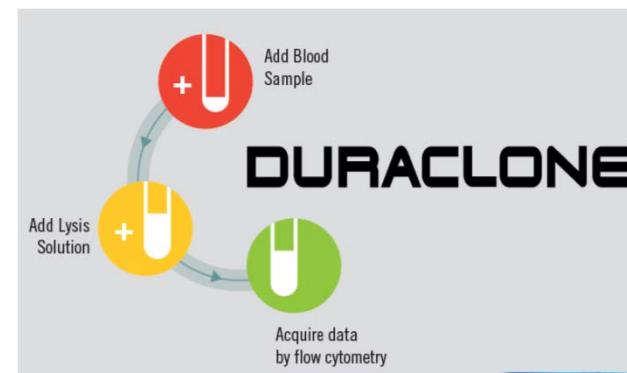
(Rovnaké klony okrem CD45)



TetraCHROME **VÝHODY** – **NEVÝHODY**

- Určené pre klinickú diagnostiku – IVD, CE
- Kvapalné protilátky, príprava koktailu, pipetovanie, chyby
- 1 skúmavková metóda
- (HLA DR v druhej skúmavke – separátne analýza)
- Zložitejšia kompenzácia

CD16



DuraClone **VÝHODY** – **NEVÝHODY**

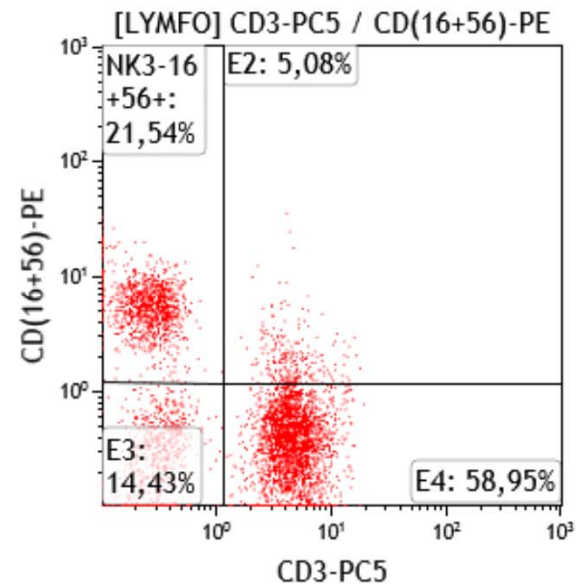
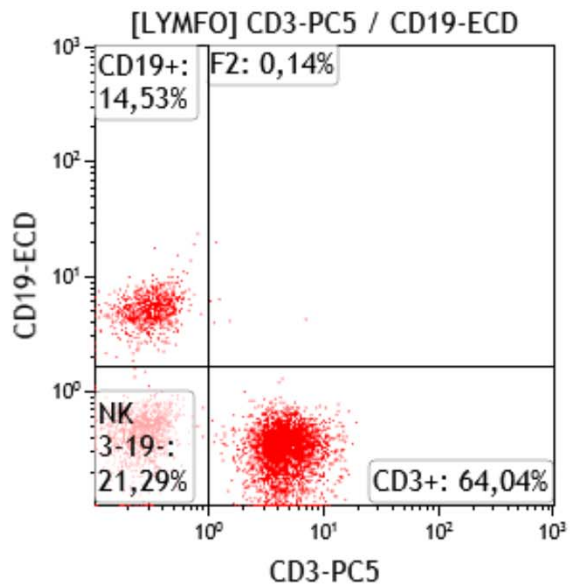
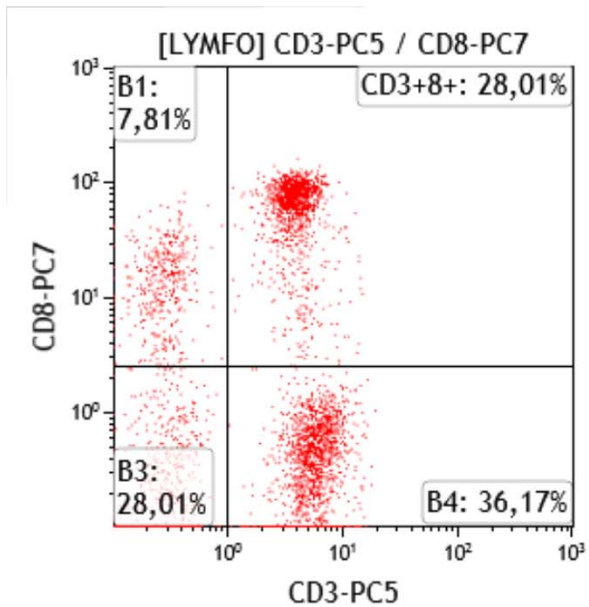
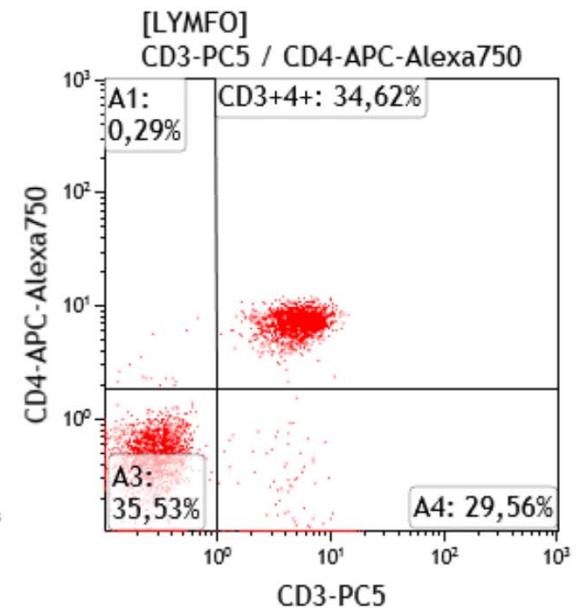
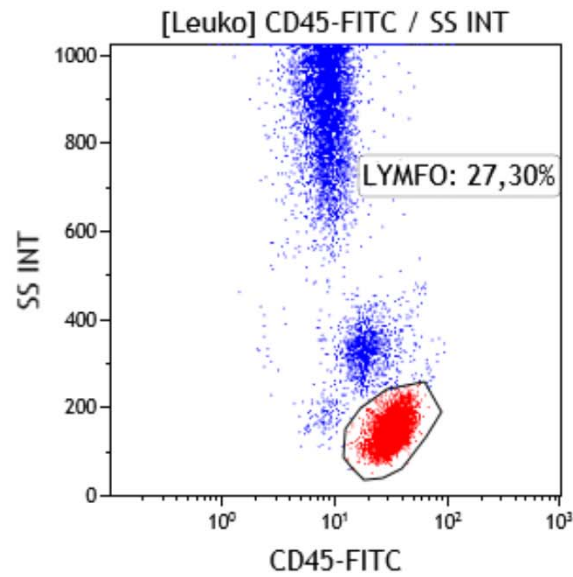
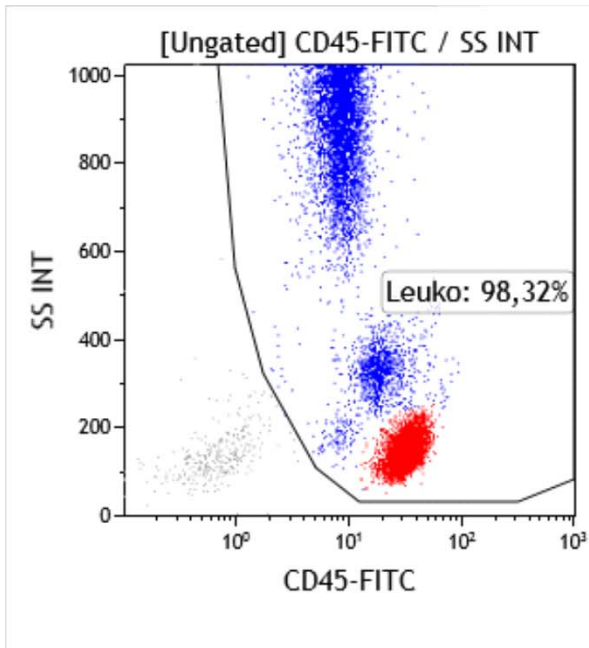
- Určené pre klinický výskum – RUO
- Ready to use, redukcia pipetovania (workflow)
- Štandardizácia - unifikácia
- 1 skúmavková metóda vrátane HLADR (rovnaký protokol)
- Subpopulácie monocytov
- Kompenzačný kit v každom balení
- RT - skladovanie



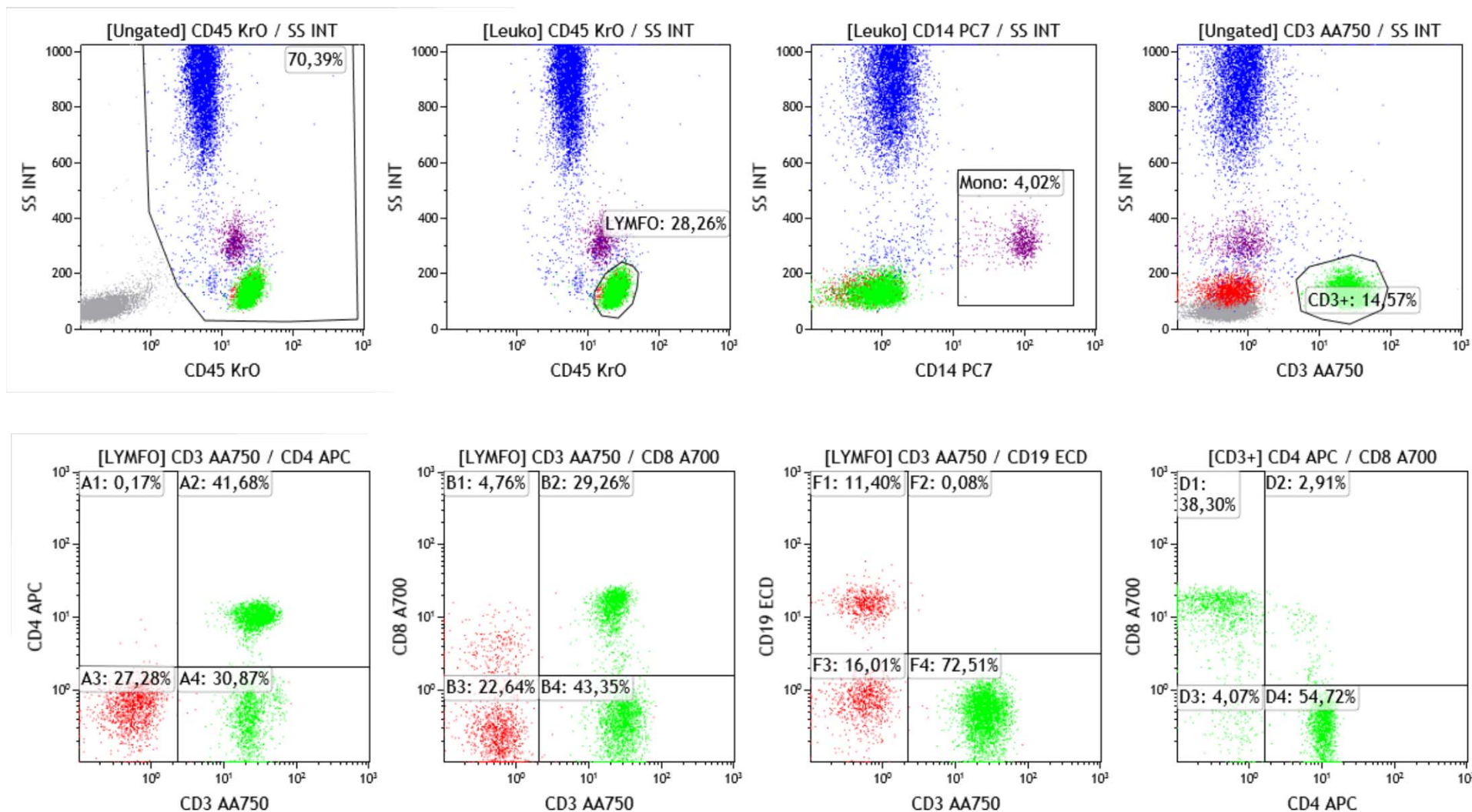
DESIGN ŠTÚDIE

- Pacienti – náhodný výber, N=30
- bez ohľadu na diagnózu, vek, pohlavie
- analýza v priebehu mesiaca v 4 nezávislých dňoch
- analýza vykonaná paralelne farbením rovnakej vzorky EDTA krvi pacienta
- cytometrická analýza výsledkov software Kaluza ver. 2.0
- zvolená stratégia gatovania
- Porovnávané parametre subpopulácií lymfocytov – percentuálne počty :
T - CD3+ , Th - CD3+4+, Tc - CD3+8+, B - CD19+3-, NK - CD 3- 16+- 56+-
- Štatistika – korelácia Pearson, korelačná krivka

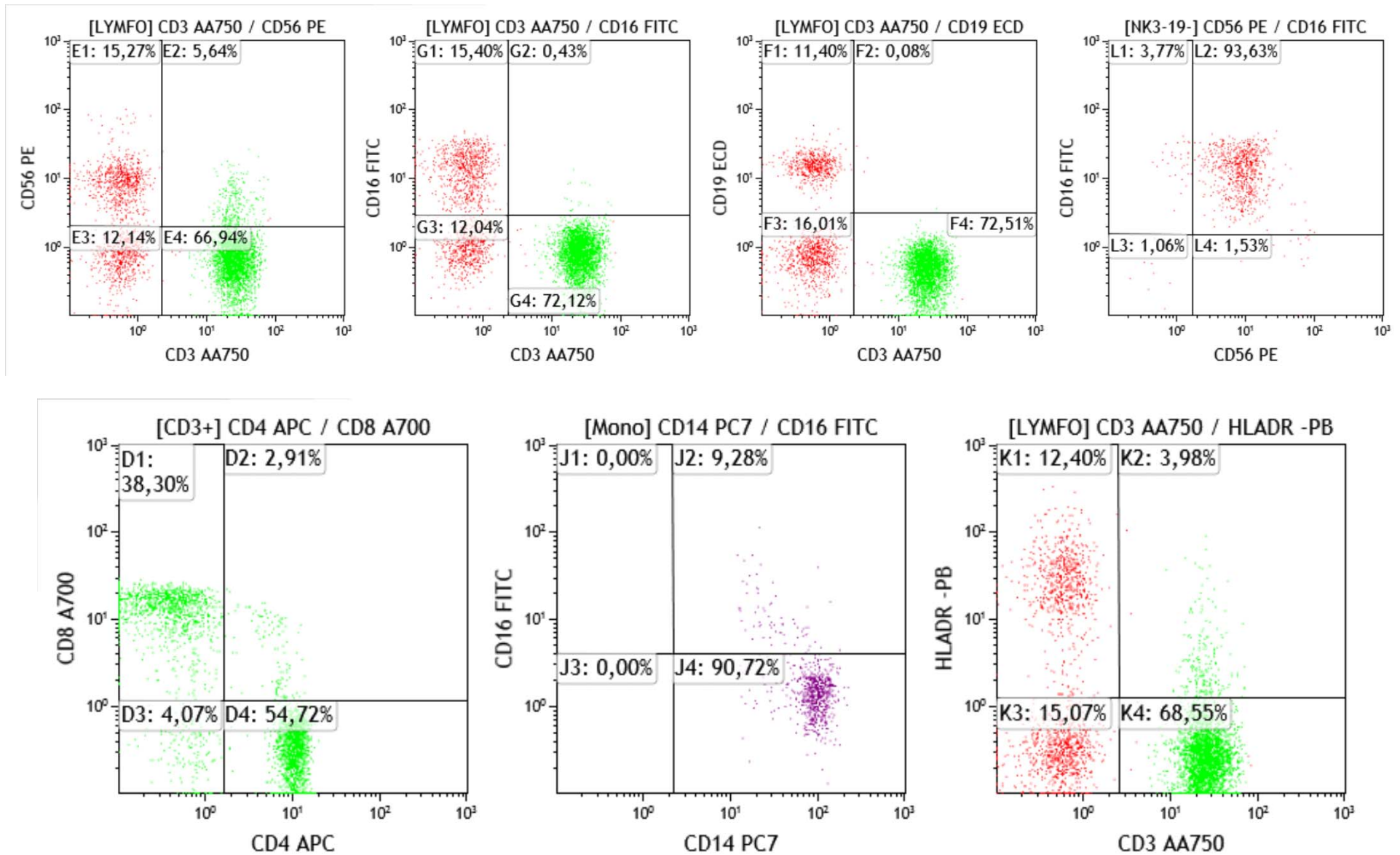
STRATÉGIA GATINGU– TCH 6 COLOR



NAVIOS EX AKVIZIČNÝ PROTOKOL – DURACLONE BASIC



NAVIOS EX AKVIZIČNÝ PROTOKOL – DURACLONE BASIC



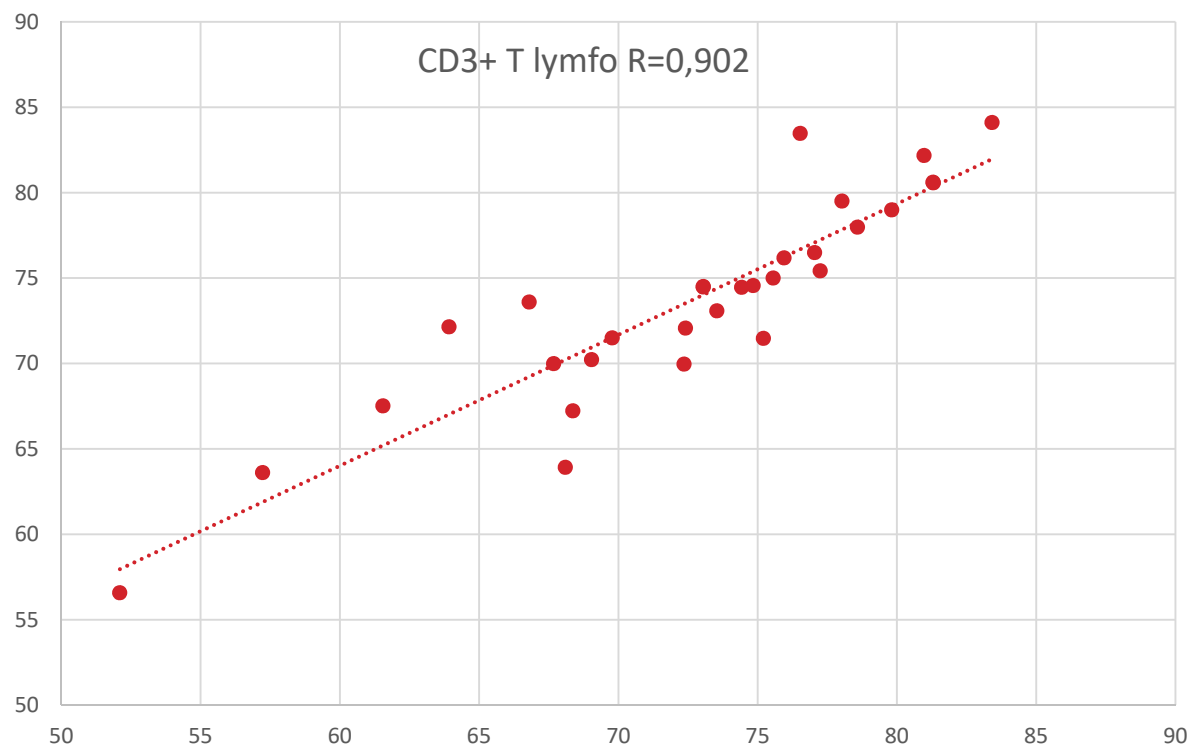
VÝSLEDKY

| PACIENT | CD3+T | CD3+D | CD3+4+T | CD3+4+D | CD3+8+T | CD3+8+D | CD19+T | CD19+D | NK T | NK D | ISUM T | ISUM D |
|---------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
| 1 | 83,42 | 84,1 | 47,41 | 48,4 | 26,51 | 25,3 | 5,9 | 5,76 | 9,99 | 9,78 | 99,31 | 99,64 |
| 2 | 74,43 | 74,46 | 49,51 | 49,18 | 21,15 | 21,36 | 18,9 | 18,25 | 6,55 | 6,97 | 99,88 | 99,68 |
| 3 | 78,59 | 77,98 | 42,56 | 43,53 | 24,47 | 24,46 | 11,05 | 11,76 | 9,6 | 10,03 | 99,24 | 99,77 |
| 4 | 68,37 | 67,22 | 40,14 | 39,43 | 21,71 | 21,19 | 20,27 | 23,05 | 10,39 | 8,99 | 99,03 | 99,26 |
| 5 | 68,1 | 63,92 | 47,7 | 45,5 | 19,2 | 17,26 | 19 | 18,5 | 11,6 | 17,3 | 98,7 | 99,72 |
| 6 | 78,03 | 79,5 | 30,35 | 29,24 | 31,24 | 33,92 | 12,19 | 11,08 | 8,87 | 9,17 | 99,09 | 99,75 |
| 7 | 74,84 | 74,56 | 46,23 | 44,73 | 15,02 | 14,35 | 18,03 | 17,94 | 6,77 | 7,94 | 99,64 | 100,44 |
| 8 | 76,53 | 83,47 | 41,33 | 45,98 | 31,64 | 34,83 | 12,58 | 8,42 | 10,46 | 7,84 | 99,57 | 99,73 |
| 9 | 66,8 | 73,59 | 42,08 | 47,85 | 22,94 | 23,4 | 13,7 | 10,16 | 18,93 | 16,23 | 99,43 | 99,98 |
| 10 | 52,1 | 56,57 | 36,14 | 38,16 | 13,85 | 16,21 | 7,75 | 6,04 | 39,48 | 37,14 | 99,33 | 99,75 |
| 11 | 75,95 | 76,18 | 35 | 34,74 | 35,3 | 34,56 | 10,59 | 10,48 | 13,18 | 12,8 | 99,72 | 99,46 |
| 12 | 81,31 | 80,57 | 55,81 | 54,76 | 22,13 | 22,07 | 12,6 | 13,32 | 5,49 | 5,72 | 99,4 | 99,61 |
| 13 | 73,54 | 73,08 | 50,16 | 49,81 | 21,9 | 21,9 | 18,24 | 18,54 | 7,55 | 7,95 | 99,33 | 99,57 |
| 14 | 75,56 | 75 | 44,94 | 43,82 | 15,44 | 14,71 | 16,41 | 16,6 | 7,6 | 8,03 | 99,57 | 99,63 |
| 15 | 81,3 | 80,61 | 45,98 | 43,43 | 32,31 | 34,38 | 11,54 | 12,42 | 6,64 | 6,89 | 99,48 | 99,92 |
| 16 | 77,25 | 75,42 | 49,48 | 48,57 | 20,25 | 19,69 | 9,47 | 10,72 | 12,98 | 13,48 | 99,7 | 99,62 |
| 17 | 75,21 | 71,47 | 61,94 | 58,14 | 15,78 | 16,44 | 15,81 | 18,05 | 8,26 | 10,19 | 99,28 | 99,71 |
| 18 | 63,92 | 72,14 | 34,57 | 41,33 | 27,43 | 29,35 | 14,7 | 11,44 | 21,11 | 16,17 | 99,73 | 99,75 |
| 19 | 69,04 | 70,22 | 47,41 | 47,66 | 16,35 | 17,33 | 12,15 | 11,99 | 18,25 | 17,49 | 99,44 | 99,7 |
| 20 | 73,05 | 74,47 | 46,09 | 46,47 | 28,22 | 29,12 | 6,83 | 6,32 | 19,93 | 18,82 | 99,81 | 99,61 |
| 21 | 73,05 | 74,5 | 40,31 | 47,57 | 20,19 | 24,21 | 12,43 | 8,4 | 24,05 | 17,05 | 109,53 | 99,95 |
| 22 | 77,05 | 76,49 | 45,62 | 44,45 | 28,24 | 29,16 | 14,26 | 14,58 | 8,43 | 8,66 | 99,74 | 99,73 |
| 23 | 67,68 | 69,99 | 43,94 | 44,75 | 21,83 | 23,87 | 15,49 | 14,6 | 16,47 | 15,14 | 99,64 | 99,73 |
| 24 | 61,55 | 67,51 | 33,46 | 36,07 | 22,74 | 24,82 | 23,87 | 18,61 | 13,71 | 13,53 | 99,13 | 99,65 |
| 25 | 57,23 | 63,61 | 28,59 | 31,5 | 18,85 | 20,28 | 27,32 | 22,98 | 14,02 | 12,97 | 98,57 | 99,56 |
| 26 | 69,78 | 71,5 | 42,41 | 43,62 | 25,58 | 24,99 | 13,47 | 12,94 | 16,73 | 15,4 | 99,98 | 99,84 |
| 27 | 72,41 | 72,07 | 49,46 | 48,36 | 22,12 | 21,84 | 12,76 | 12,13 | 14,3 | 15,67 | 99,47 | 99,87 |
| 28 | 79,82 | 78,99 | 55,1 | 54,76 | 20,13 | 20,51 | 11,97 | 11,79 | 8,01 | 9,16 | 99,8 | 99,94 |
| 29 | 80,98 | 82,17 | 44,38 | 45,22 | 32,57 | 33,94 | 9,5 | 9,53 | 8,95 | 8,2 | 99,43 | 99,9 |
| 30 | 72,36 | 69,96 | 49,42 | 47,43 | 22,6 | 22,83 | 18,17 | 20,63 | 8,84 | 8,93 | 99,37 | 99,52 |

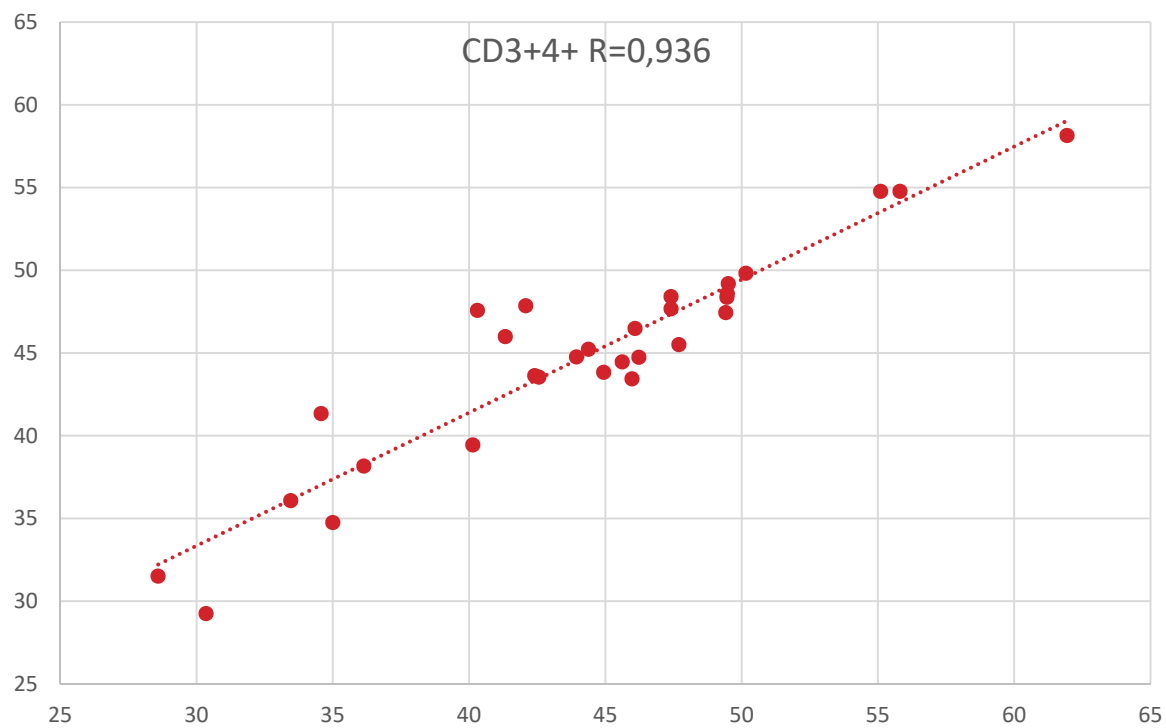
D- Duraclone Basic

T- TetraChrome 6 color

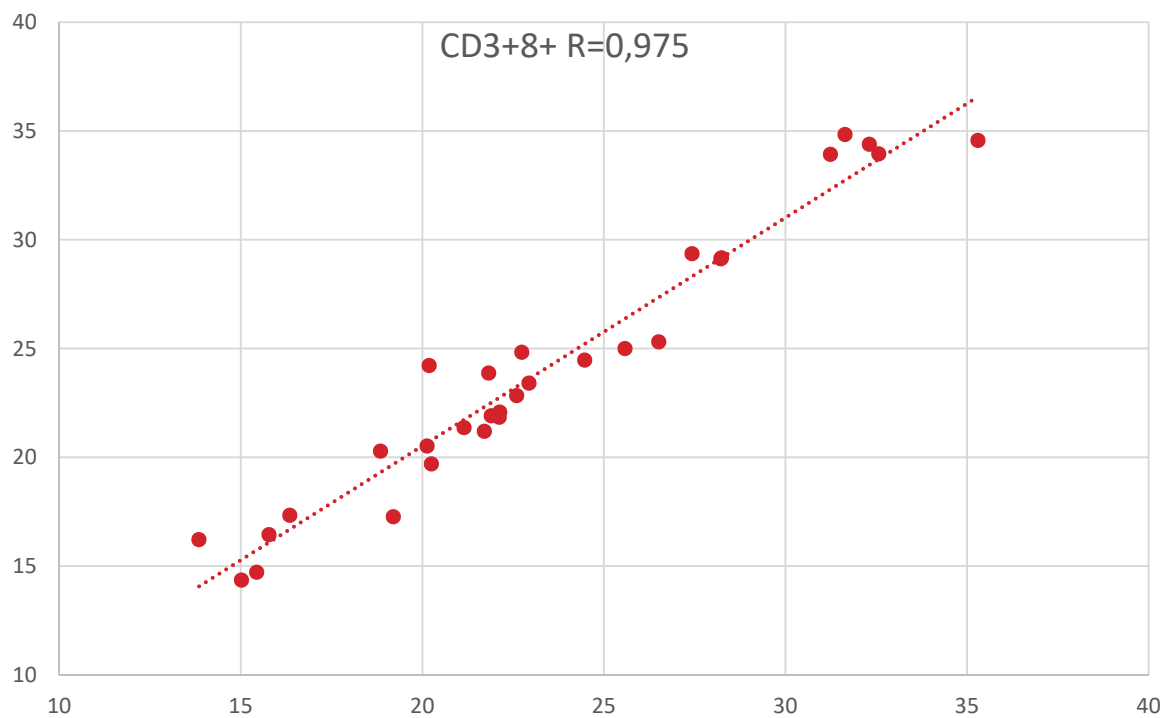
VÝSLEDKY CD3+ T LYMFOCYTY %



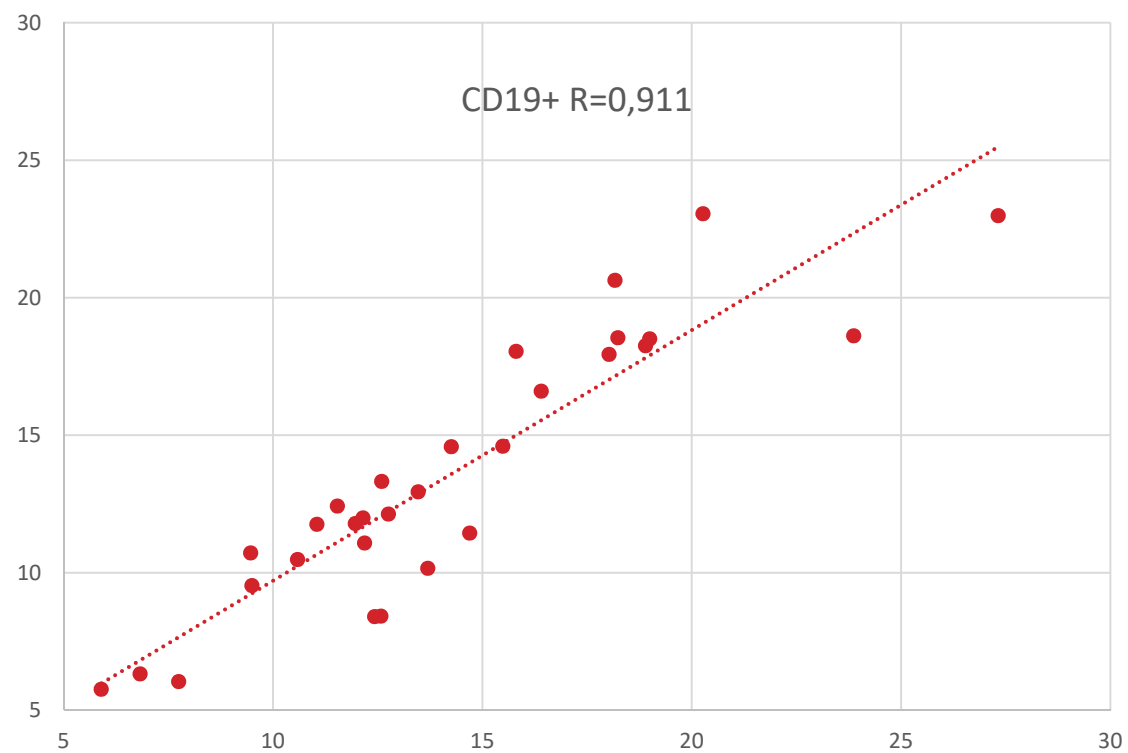
VÝSLEDKY CD3+4+ TH LYMFOCYTY %



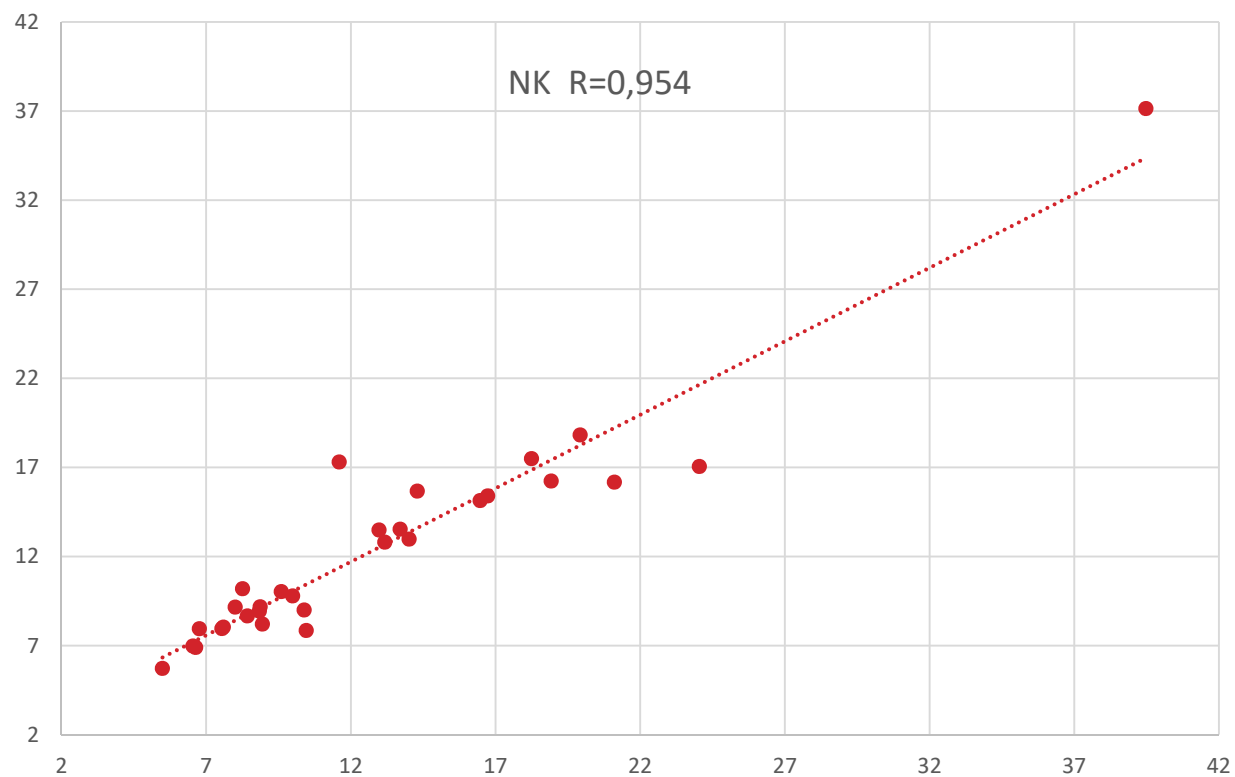
VÝSLEDKY CD3+8+ TC LYMFOCYTY %



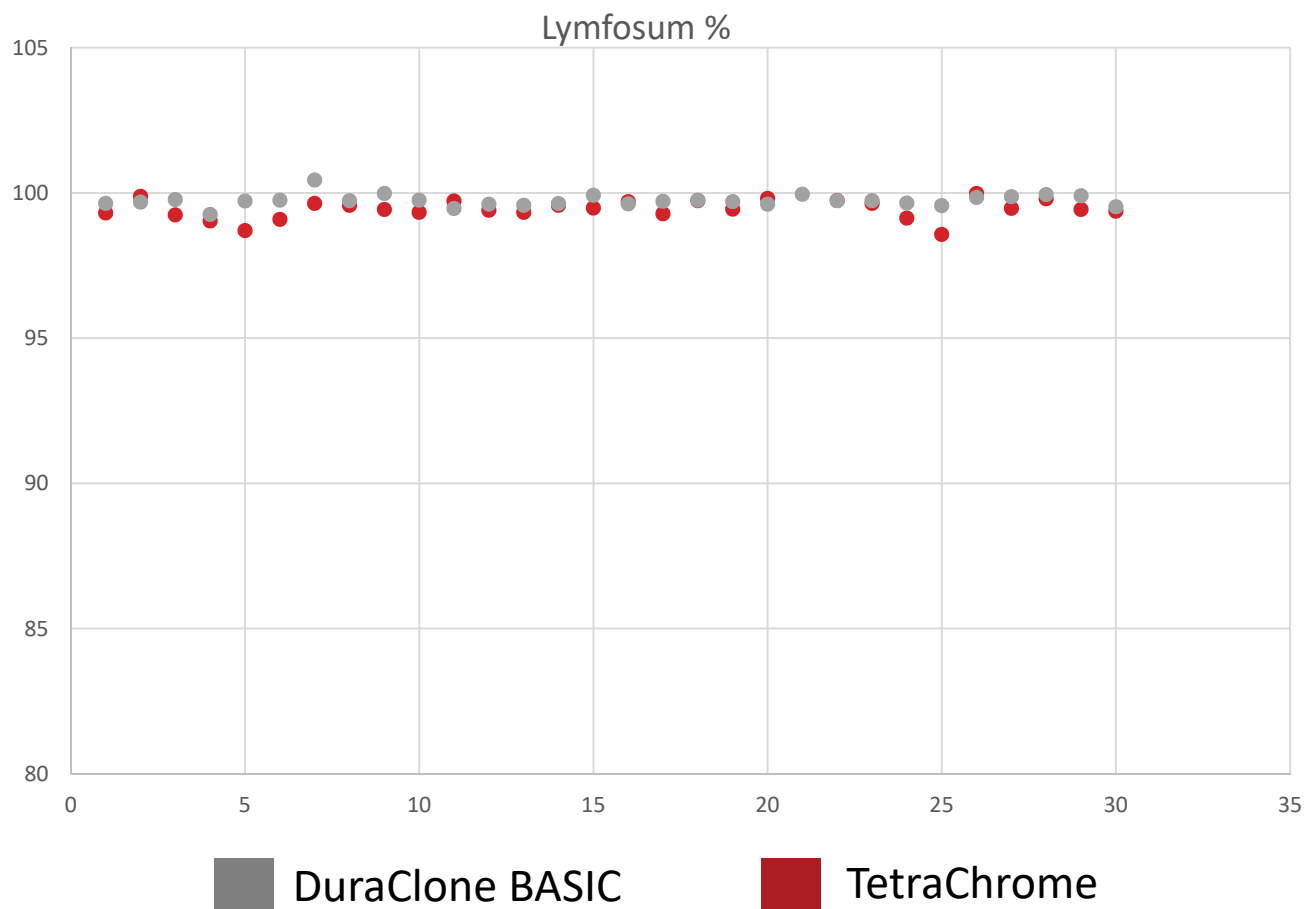
VÝSLEDKY CD3-19+ B LYMFOCYTY %



VÝSLEDKY CD3-16+56+ NK LYMFOCYTY %



VÝSLEDKY IMUNOSUM (LYMFOSUM) %

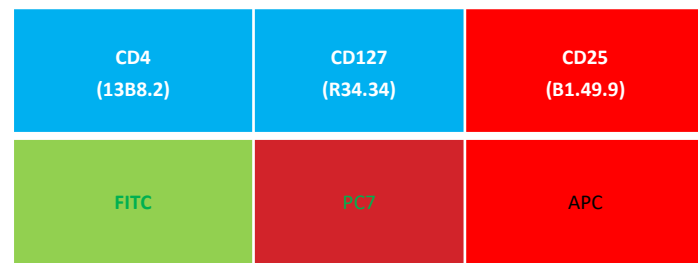


TREG - CDS – DURACLONE TECHNOLOGY

Povrchové farbenie CD4 + CD127- CD25++

CDS – Custom Design Service - DuraClone

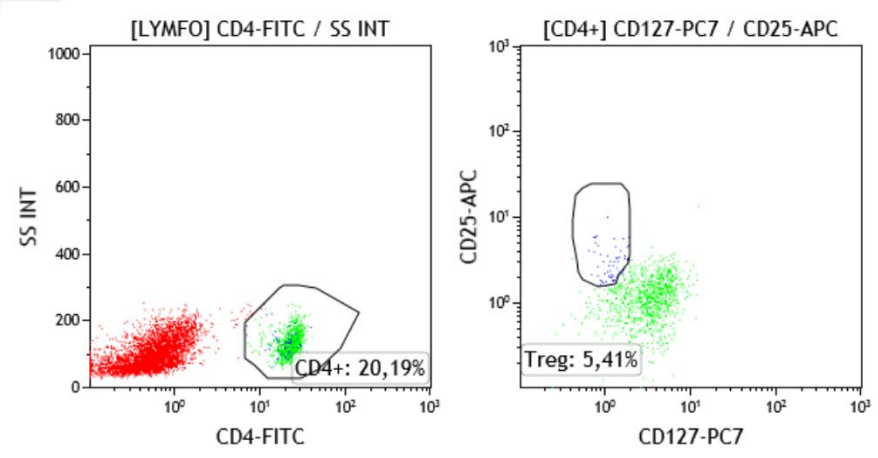
Skladovanie, štandardizácia, interlaboratórne porovnanie, pipetovanie, kompenzácia
 – 3 cytometrické pracoviská Alphamedical
 BC protilátky, minimálna kompenzácia, Navios EX



55907787 00009279 002

Instrument: Navios Acquisition Date: 11-Apr-18

| | FS | SS | FL1 | FL5 | FL6 |
|---------|------|------|------|-----|-----|
| Voltage | 435 | 430 | 405 | 430 | 425 |
| Gain | 2 | 5 | 1 | 1 | 1 |
| | FL1 | FL5 | FL6 | | |
| FL1 | | 2,50 | 2,50 | | |
| FL5 | 0,00 | | 0,00 | | |
| FL6 | 0,00 | 0,00 | | | |



ZÁVER

DuraClone technológia

- štandardizácia a reprodukovateľnosť
- Inter a intra laboratórna porovnateľnosť
- zlepšenie „workflow“
- menšia chybovosť
- Expirácia, skladovateľnosť (tandemové AB)