

# exbio

## Kit CD34 QuantiFlowEx 50 pruebas | Cat. N.º ED7080



### Instrucciones de uso (ES)

Versión: ED7080\_IFU\_v4\_ES

Fecha de emisión: 27-07-2023

#### Símbolos utilizados en el etiquetado del dispositivo

	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Límite de temperatura
	Marca CE		Mantener apartado de la luz del sol
	Fabricante		Mantener seco Mantener alejado de la lluvia
	Identificador único del dispositivo		Precaución
	Consultar instrucciones de uso		Solución concentrada (10x)
	Contiene suficiente para <n> pruebas		Contenido
	Número de catálogo		Marca UKCA
	Código de lote		
	Fecha de caducidad		

## 1. Objetivo previsto

El Kit CD34 QuantiFlowEx es adecuado para detectar y enumerar el total de células madre hematopoyéticas viables a partir del recuento total de leucocitos en sangre humana y muestras de tejido mediante citometría de flujo.

### Qué se detecta y/o mide

El Kit CD34 QuantiFlowEx detecta y mide los porcentajes relativos y recuentos absolutos de células madre hematopoyéticas humanas viables (CD34+CD45dim).

### Función del dispositivo

El dispositivo es adecuado para monitorizar el recuento de células madre hematopoyéticas en sangre periférica, médula ósea y productos de leucoféresis.

### Contexto de un estado fisiológico o patológico

La enumeración precisa del recuento de células madre hematopoyéticas (HSC) en sangre humana y muestras de tejido o injertos para trasplante es necesaria para la atención del paciente o el procesamiento de injertos <sup>(1)</sup>.

### Tipo de ensayo

No automatizado

Cuantitativo

### Tipo de muestra requerida

Sangre periférica normal, o sangre periférica movilizada, o producto(s) de leucoféresis, o médula ósea.

### Población sometida a pruebas

No es adecuado para una población específica.

## 2. Usuario previsto

El dispositivo es adecuado únicamente para uso profesional en laboratorios y no es apto para el análisis de diagnóstico inmediato o autodiagnóstico.

### Requisitos de cualificación

El usuario previsto deberá tener una experiencia avanzada en el análisis de la citometría de flujo de células humanas, técnicas de laboratorio estándar, incluidas habilidades de pipeteo, manipulación segura y adecuada de muestras derivadas del cuerpo humano.

El usuario previsto deberá cumplir con la norma EN ISO 15189 u otras normas nacionales, según corresponda.

### 3. Principio de prueba

El principio de la prueba se basa en la detección de la unión de anticuerpos monoclonales a una molécula específica (antígeno) expresada por ciertas células sanguíneas humanas. Los anticuerpos monoclonales utilizados en la prueba están marcados con diferentes fluorocromos excitados por el haz láser de un citómetro de flujo, durante la adquisición de una muestra de sangre tintada con anticuerpos. Posteriormente, el instrumento recoge y analiza la fluorescencia (emisión de luz) de cada fluorocromo presente en una célula sanguínea adquirida. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la densidad de expresión del antígeno en una célula, lo que permite separar diferentes subconjuntos celulares.

7-AAD es un tinte impermeable a la membrana celular que se excluye de las células viables y se une al ADN en las células no viables. Las diferencias en la intensidad de la fluorescencia celular permiten excluir del análisis las células no viables.

### 4. Reactivo(s) suministrado(s)

#### Contenido

El Kit CD34 QuantiFlowEx es suficiente para 50 pruebas y se suministra con los siguientes reactivos:

**Staining Reagent** (ED7080-1; 1 vial) que contiene 1 ml de una combinación premezclada de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo CD45 FITC y CD34 PE, diluidos a concentraciones óptimas en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) estabilizadora que contiene 15 mM de azida de sodio, consulte la Tabla 1 .

**7-AAD** (ED7080-2; 1 vial) que contiene 1 ml de tinte de viabilidad celular -7-aminoactinomicina D (7-AAD), diluido a la concentración óptima en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) estabilizadora que contiene 15 mM de azida de sodio.

**Lysing Solution** (ED7080-3; 1 botella) que contiene 15 ml de solución tamponada concentrada (10X) a base de cloruro de amonio y sin fijador.

#### Composición

**Tabla 1** Descripción y concentraciones de los componentes activos

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Isotipo	Concentración (µg/ml)
CD45	FITC	MEM-28	IgG1	30
CD34	PE	4H11 [APG]	IgG1	35

## 5. Materiales necesarios pero no proporcionados

### Para el método de doble plataforma y plataforma única

Tubos de ensayo de fondo redondo (12 x 75 mm)

Agua desionizada (grado reactivo)

Células de control del proceso (Streck CD-Chex CD34<sup>®</sup>, CD34 control – 3 niveles, n.º cat. 213337, 213347, 213383 o control de células lisables equivalente con recuento predefinido de las HSC CD34)

### Solo para el método de plataforma única

Estándar de recuento de células fluorescentes

- para uso en citómetros Becton Dickinson
  - o Tubos TruCount™ de BD
- para uso en citómetros Beckman Coulter
  - o Flow-Count™ Fluorospheres de Beckman Coulter

## 6. Equipamiento necesario

### Para el método de doble plataforma y plataforma única

Pipeta automática con puntas desechables (20 - 100 µl) para pipetear muestras y reactivos

Dispensador de líquido o pipeta con puntas desechables (2 ml) para dispensar la solución de lisis de eritrocitos

Perlas de recuento (tubos TruCount™ de BD Biosciences, n.º ref. 663028), Flow-Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter; n.º ref. 7547053)

Agitador vórtex

Citómetro de flujo con una fuente de excitación láser (488 nm), detectores de luz dispersa, filtros ópticos y detectores de emisión adecuados para recopilar señales de los fluorocromos que figuran en la Tabla 2.

**Tabla 2** Características espectrales de los fluorocromos utilizados en el dispositivo

Fluorocromo	Excitación [nm]	Emisión [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
7-AAD	488	670

**AVISO:** El dispositivo se probó en citómetros de flujo BD FACSCanto™ (BD Biosciences), Navios (Beckman Coulter) y XF-1600 (Sysmex).

## **Solo para el método de doble plataforma**

Analizador hematológico (para recuentos absolutos de células) capaz de realizar recuentos de glóbulos blancos (WBC) y linfocitos por  $\mu\text{l}$  de muestra.

## **7. Almacenamiento y manipulación**

Guarde a una temperatura de 2-8° C.

Evite la exposición prolongada a la luz.

No congele.

Consulte la sección 10 Procedimiento (Preparación de reactivos) para obtener información sobre la estabilidad en uso y la vida útil después de abrirlo por primera vez, junto con las condiciones de almacenamiento y la estabilidad de las soluciones de trabajo (cuando corresponda).

## **8. Advertencias, precauciones y limitaciones de uso**

### **Clasificación de peligrosidad del SGA**

Consulte la Ficha de datos de seguridad (FDS) disponible en la página del producto en [www.exbio.cz](http://www.exbio.cz) para obtener información completa sobre los riesgos que presentan las sustancias y mezclas químicas contenidas en el producto y cómo deben manipularse y eliminarse.

### **Peligro biológico**

Las muestras biológicas humanas y las muestras de sangre y cualquier material que entre en contacto con ellas siempre se consideran materiales infecciosos.

Utilice un equipo de seguridad y protección personal para evitar el contacto con la piel, los ojos y las mucosas.

Siga todas las leyes, reglamentos y procedimientos aplicables para manipular y desechar materiales infecciosos.

### **Pruebas de deterioro**

La apariencia normal de los reactivos proporcionados es la de un líquido transparente. No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto, por ejemplo, turbidez o signos de precipitación.

### **Limitación de uso**

No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del producto.

## 9. Muestra

Utilice sangre o material tisular recogido en un recipiente de muestras clasificado como dispositivo médico, con el anticoagulante EDTA, heparina o ACD (ácido-citrato-dextrosa).

La muestra siguiente se puede analizar usando el dispositivo:

sangre periférica normal y movilizada, productos de leucoféresis y médula ósea.

**AVISO:** Para el análisis por doble plataforma, determine el recuento absoluto de leucocitos en la muestra recogida mediante un analizador hematológico. El Kit CD34 QuantiFlowEx por sí solo no proporciona la enumeración para recuentos absolutos de células.

Procese la muestra de sangre como máximo 24 horas después de la extracción.

## 10. Procedimiento

### **Preparación de reactivo(s) suministrado(s)**

#### Staining Reagent y 7-AAD

Los reactivos no necesitan preparación.

El reactivo debe alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso. Mantenga seco el recipiente principal del dispositivo.

Utilice el reactivo directamente de su envase primario original.

Tras la primera apertura, el reactivo conserva sus características de rendimiento hasta la fecha de caducidad si se almacena en las condiciones indicadas en su envase primario original.

**PRECAUCIÓN:** No diluya el reactivo.

#### Lysing Solution

Diluya la solución de lisis de eritrocitos concentrada (10X) con la solución de lisis de trabajo (1X) con agua desionizada.

**PRECAUCIÓN:** La solución de lisis de trabajo (1X) solo es estable **durante 1 día**. Prepare una solución de lisis de trabajo nueva (1X) cada día de medición mezclando 1 parte de solución de lisis concentrada (10X) con 9 partes de agua desionizada y guárdela en el dispensador de líquido o recipiente cerrado a temperatura ambiente.

### **Preparación de materiales necesarios pero no suministrados**

Para la preparación y el uso de estándares de recuento de células fluorescentes, siga las instrucciones del fabricante.

## Control de calidad

Utilice Streck CD-Chex CD34<sup>®</sup> o células de control equivalentes como control del procedimiento positivo para garantizar el rendimiento adecuado del dispositivo según lo previsto. Streck CD-Chex CD34<sup>®</sup> proporciona valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos de las HSC CD34+.

Tiña las células de control con el Kit CD34 QuantiFlowEx de acuerdo con el procesamiento de la muestra cómo se especifica en las instrucciones de uso. Verifique que los resultados obtenidos (% de células positivas) estén dentro del rango esperado informado para el lote usado de células de control.

## Tinción de muestras: método de plataforma única

1. Para cada muestra, etiquete un tubo de ensayo de fondo redondo de 12 × 75 mm con la identificación adecuada de la muestra.

**AVISO:** Utilice el tubo TruCount™ de BD como tubo de ensayo para el recuento absoluto de células madre CD34.

2. Pipetee 20 µl de Staining Reagent en el fondo del tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
3. Pipetee 20 µl de 7-AAD en el fondo del tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
4. Pipetee 100 µl de muestra bien mezclada en el fondo del tubo de ensayo utilizando la técnica de pipeteo inverso.

**PRECAUCIÓN:** La precisión del pipeteo es fundamental para la enumeración del recuento absoluto de células madre CD34+. Por lo tanto, se debe utilizar la técnica de pipeteo inverso con una pipeta volumétrica automática

Para la aspiración de la muestra con pipeteo inverso, presione la perilla de la pipeta hasta su segundo tope y aspire la muestra. Luego coloque la punta de la pipeta que contiene la muestra de sangre cerca del fondo del tubo y presione la perilla de la pipeta hasta su primer tope para dispensar la muestra.

Evite pipetear sangre en el lateral del tubo de ensayo. Si el frotis o la gota de sangre permanecen en el lateral del tubo, es posible que no se tiñan con el reactivo, o que los eritrocitos no se lisen, y que el resultado de la prueba no sea válido.

5. Agite e incube el tubo de ensayo durante 20-30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
6. Añada 2 ml de solución de lisis de trabajo (1X) al tubo de ensayo.
7. Agite e incube el tubo de ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
8. Si no utilizó el tubo TruCount™ de BD como tubo de ensayo, añada 100 µl de

Flow-Count™ Fluorospheres utilizando la técnica de pipeteo inverso. Siga las instrucciones del fabricante.

9. Adquiera la muestra tintada inmediatamente en el citómetro de flujo. Si la muestra tintada no se adquiere inmediatamente, tape el tubo de ensayo, guárdela a una temperatura de 2-8 °C en la oscuridad y analícela en un plazo de 2 horas.

**PRECAUCIÓN:** Agite la muestra teñida inmediatamente antes de la adquisición en el citómetro de flujo para evitar agregados.

### **Tinción de muestras: método de doble plataforma**

**PRECAUCIÓN:** Determine el recuento absoluto de leucocitos en la muestra recogida mediante un analizador hematológico antes de su procesamiento.

1. Para cada muestra, etiquete un tubo de ensayo de fondo redondo de 12 × 75 mm con la identificación adecuada de la muestra.
2. Pipetee 20 µl de Staining Reagent en el fondo del tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
3. Pipetee 20 µl de 7-AAD en el fondo del tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
4. Pipetee 100 µl de muestra bien mezclada en el fondo del tubo de ensayo utilizando la técnica de pipeteo inverso.
5. Agite e incube el tubo de ensayo durante 20-30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
6. Añada 2 ml de solución de lisis de trabajo (1X) al tubo de ensayo.
7. Agite e incube el tubo de ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
8. Adquiera la muestra tintada inmediatamente en el citómetro de flujo. Si la muestra tintada no se adquiere inmediatamente, tape el tubo de ensayo, guárdela a una temperatura de 2-8 °C en la oscuridad y analícela en un plazo de 2 horas.

**PRECAUCIÓN:** Agite la muestra teñida inmediatamente antes de la adquisición en el citómetro de flujo para evitar agregados.

### **Análisis por citometría de flujo**

El citómetro de flujo seleccionado para su uso con el Kit CD34 QuantiFlowEx debe calibrarse de forma rutinaria utilizando microesferas fluorescentes para garantizar una sensibilidad estable de los detectores de acuerdo con las instrucciones del fabricante del citómetro.

Si no se realiza un mantenimiento adecuado del citómetro de flujo, puede producir



resultados falsos.

Consulte las especificaciones del fabricante del citómetro para láseres y detectores de fluorescencia de acuerdo con las características de excitación y emisión de los fluorocromos en la sección 6 (Equipo necesario).

Ajuste la tensión de los detectores de fluorescencia de interés antes del análisis de la muestra tintada. La tensión de un detector PMT debe ajustarse lo suficientemente alta, para que el mínimo de eventos de tinción interfiera negativamente con el canal 0 en el eje de fluorescencia. Además, la tensión del detector PMT no debe superar los valores en los que los eventos positivos se presionan hacia el eje derecho.

Según la muestra, adquiera al menos 300 000 – 1 000 000 de eventos por tubo.

Adquiera siempre los parámetros de dispersión de luz de la célula: Dispersión frontal (tanto del área de señal como de la altura de señal) y dispersión lateral (perpendicular) (tanto del área de señal como de la altura de señal).

Para el método de **plataforma única**, establezca el umbral de fluorescencia en el detector FITC en lugar del tamaño del evento para la recopilación de datos. El umbral en la dispersión frontal (tamaño del evento) puede excluir eventos de micropartículas del estándar de recuento del análisis, lo que influiría negativamente en la enumeración del porcentaje de células madre CD34+.

Para el método de **doble plataforma**, establezca el umbral en la dispersión frontal.

Compense las señales de fluorescencia entre los detectores antes o después de la adquisición de datos. Los datos se pueden interpretar incorrectamente si las señales de fluorescencia no se compensan correctamente o si las puertas se colocan de forma incorrecta.

**AVISO:** Las muestras con una viabilidad celular baja prevista deben utilizarse para la preparación del control de compensación de 7-AAD, por ejemplo, células sanguíneas procesadas con solución de lisis basada en formaldehído. Las muestras con viabilidad celular alta proporcionan un número bajo de células muertas. Un recuento bajo de células muertas puede influir negativamente en la intensidad media de fluorescencia 7-AAD de las células muertas y producir una compensación inadecuada.

Para el análisis de los datos medidos, es posible utilizar el software del citómetro desarrollado por el fabricante o un software específico para el análisis de datos de la citometría fuera de línea (por ejemplo, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

### **Análisis de datos de la muestra tintada con el Kit CD34 QuantiFlowEx**

Analice los datos medidos y compensados utilizando el software adecuado. Se aplicará el protocolo de activación de la Sociedad Internacional de Hematoterapia e Ingeniería de Injertos (ISHAGE) (figura 1-5) para la enumeración del porcentaje de células madre vivas CD34+.

Con el uso de 5 parámetros (2 parámetros de dispersión de luz y 3 parámetros fluorescentes), las células madre hematopoyéticas CD34+ se identifican mediante una combinación de activación secuencial y booleana según sus propiedades.

Las células madre CD34+ verdaderas expresan el antígeno CD34 y CD45, sin embargo, la expresión de CD45 es similar a la de las células blásticas. La intensidad de la tinción es detectable pero menor que, por ejemplo, en los linfocitos.

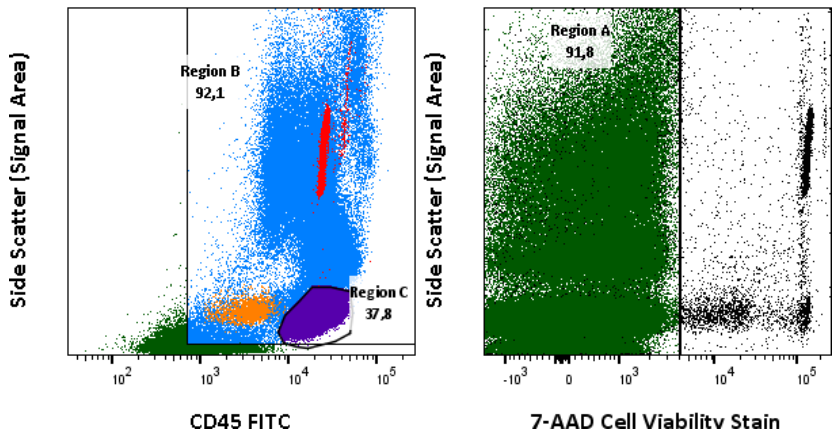
Las células madre CD34+ verdaderas también proporcionan una señal de dispersión frontal similar a las células blásticas o los linfocitos y exhiben propiedades de dispersión de luz perpendicular baja (dispersión lateral).

Las figuras 1-5 muestran la secuencia de activación lógica que garantiza la identificación precisa de células madre CD34<sup>+</sup> vivas para una enumeración porcentual precisa.

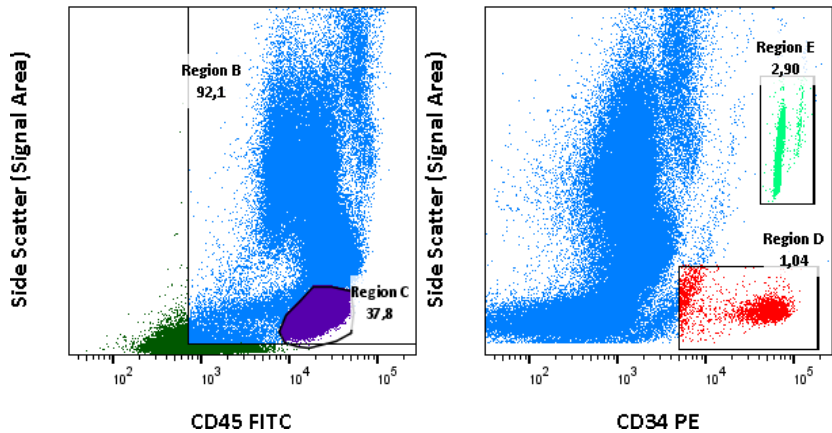
**Figura 1** La imagen de la izquierda representa todos los eventos cerrados de las Regiones A, B, C, G (derivadas de la Región F) e I.

Primero, visualice todos los eventos en un área de señales de dispersión lateral (SSC-A) frente a Diagrama de puntos de tinción de la viabilidad de 7-AAD y colocación de una puerta alrededor de las células vivas (negativo de 7-AAD) como se muestra en la Región A en la imagen de la derecha.

**Nota:** Cuando se utiliza un control de sangre estabilizado como, por ejemplo, Streck CD-Chex CD34<sup>®</sup>, es muy recomendable comprobar la viabilidad de la Región A y cambiar la posición de la región si es necesario, ya que la sangre estabilizada contiene formaldehído que penetra en la membrana celular y da como resultado una tinción positiva con el tinte de viabilidad 7-AAD.

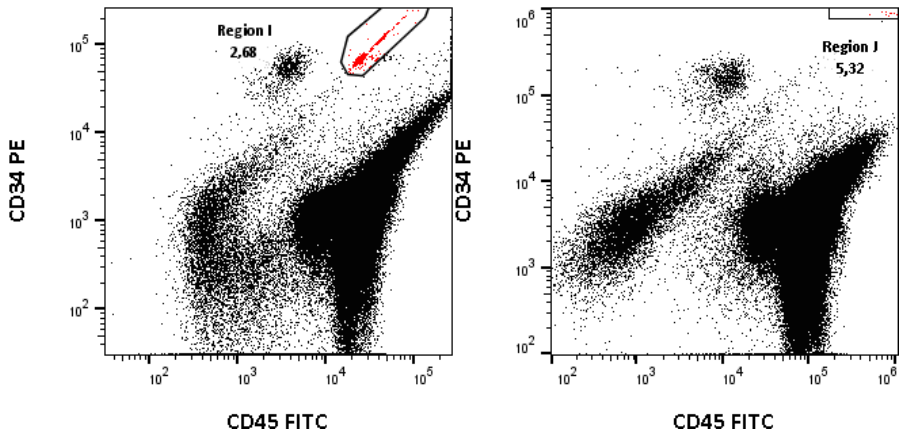


**Figura 2** Visualice las células de la Región A en un diagrama de puntos de SSC-A frente a CD45 FITC y coloque una puerta alrededor de los **leucocitos (Región B)** y otra alrededor de los **linfocitos** representada como **Región C**. Lleve las células de la Región B a un diagrama de puntos SSC-A frente a CD34 PE y coloque una puerta alrededor de **eventos positivos de CD34 (Región D)**. La imagen de la derecha muestra todos los eventos que incluyen micropartículas fluorescentes de la **Región I** representadas en la **Región E**. La Región E indica las propiedades ópticas y fluorescentes del estándar de recuento de micropartículas fluorescentes presente en el tubo TruCount™ de BD.

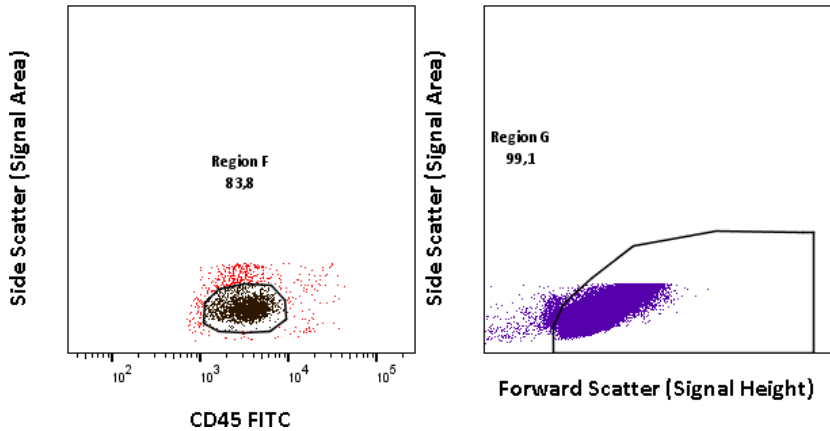


**Figura 3** Visualice **todos los eventos** en CD34 PE frente a CD45 FITC y coloque las regiones alrededor del estándar de recuento de micropartículas fluorescentes que delimitan las micropartículas del TruCount™ de BD adquiridas en el citómetro BD FACSCanto™ (**Región I**) y las micropartículas de Flow-Count™ de Beckman Coulter adquiridas en un citómetro Beckman Coulter Navios™ (**Región J**).

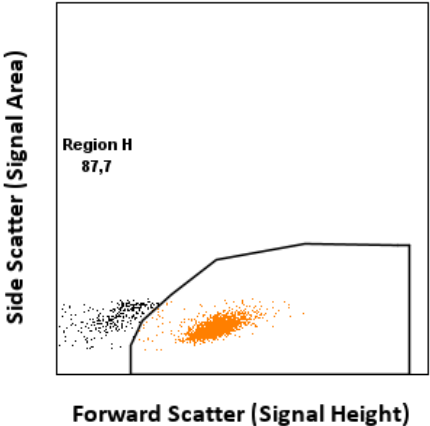
**Nota 1:** El tamaño de las perlas de recuento y las propiedades de fluorescencia pueden diferir según el fabricante. La **figura 3** representa el tamaño y las propiedades fluorescentes de las perlas presentes en el tubo de BD TruCount™ o en las Flow-Count™ Fluorospheres de Beckman Coulter.



**Figura 4** Depure los eventos CD34 positivos de la Región D colocando una **Región F** alrededor del grupo de células positivas para CD45 dim en el gráfico de puntos SSC-A frente a CD45 FITC con eventos de la Región D como se muestra en la imagen de la izquierda. Muestre los linfocitos CD45+ (Región C) en el gráfico de puntos SSC-A frente al gráfico de puntos de altura de la señal de dispersión frontal (FSC-H). Coloque una nueva puerta que delimite los linfocitos CD45+ de los residuos y eventos más pequeños (**Región G**) como se muestra en la imagen de la derecha.



**Figura 5** Copie la puerta de la **Región G** que delimita los linfocitos de la **Figura 4** (imagen derecha) y pegue la región (**Región H**) en un gráfico de puntos SSC-A frente a FSC-H que contiene los eventos de la **Región F** para diferenciar el grupo de células madre CD34+ de los residuos y eventos más pequeños. Las células de la Región F (Figura 4) que se encuentran dentro de la puerta de la **Región H** representan células madre CD34+ verdaderas.



## **Cálculo e interpretación de los resultados analíticos - Método de plataforma única**

Utilice las siguientes ecuaciones para la enumeración del recuento absoluto y porcentual de células madre CD34<sup>+</sup> vivas de todos los leucocitos vivos.

*Enumeración del recuento absoluto de células madre CD34<sup>+</sup> vivas por 1 µl de material sanguíneo:*

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

*Enumeración del recuento absoluto de leucocitos vivos por 1 µl de material sanguíneo:*

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

*Enumeración del porcentaje de células madre CD34<sup>+</sup> vivas de todos los leucocitos vivos:*

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

<i>CD34<sup>+</sup> absoluto</i>	recuento absoluto de células madre CD34 <sup>+</sup> vivas por 1 µl de material sanguíneo
<i>Glóbulos blancos Abs.</i>	recuento absoluto de leucocitos vivos por 1 µl de material sanguíneo
<i>% CD34<sup>+</sup></i>	porcentaje de células madre CD34 <sup>+</sup> vivas de todos los leucocitos vivos
<i>Región B</i>	número de eventos en la Región B (leucocitos)
<i>Región H</i>	células madre CD34 <sup>+</sup> verdaderas
<i>Región E</i>	número de eventos en la Región E (micropartículas)
<i>P</i>	número de micropartículas por prueba (presentes en el tubo de ensayo) indicado por el fabricante de las micropartículas
<i>V</i>	volumen de muestra - 100 µl
<i>DF</i>	factor de dilución (dilución de la muestra antes de la tinción); DF = 2 significa que 1 parte de la sangre (100 µl) se ha diluido con 1 parte de PBS que contenía 0,5 % de BSA (100 µl)

## **Cálculo e interpretación de resultados analíticos - Método de doble plataforma**

Utilice un analizador hematológico para definir el recuento de leucocitos por µl de muestra. Consulte las instrucciones del fabricante del analizador hematológico.

Utilice las siguientes ecuaciones para la enumeración del recuento absoluto y



porcentual de células madre CD34<sup>+</sup> vivas de todos los leucocitos vivos.

*Enumeración del recuento absoluto de células madre CD34<sup>+</sup> vivas por 1 µl de material sanguíneo:*

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

*Enumeración del porcentaje de células madre CD34<sup>+</sup> vivas de todos los leucocitos vivos:*

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

<i>CD34<sup>+</sup> absoluto</i>	recuento absoluto de células madre CD34 <sup>+</sup> vivas por 1 µl de material sanguíneo
<i>Glóbulos blancos Abs.</i>	recuento absoluto de leucocitos vivos por 1 µl de material sanguíneo definido mediante un analizador hematológico
<i>% CD34<sup>+</sup></i>	porcentaje de células madre CD34 <sup>+</sup> vivas de todos los leucocitos vivos
<i>Región B</i>	número de eventos en la Región B (leucocitos)
<i>Región G</i>	número de células madre CD34 <sup>+</sup> verdaderas
<i>DF</i>	factor de dilución (dilución de la muestra antes de la tinción); DF = 2 significa que 1 parte de la sangre (100 µl) se ha diluido con 1 parte de PBS que contenía 0,5 % de BSA (100 µl)

## 11. Rendimiento analítico

### Especificidad

El anticuerpo MEM-28 reconoce todas las isoformas leucocitarias del CD45 humano (receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C). HLDA Workshop (HLDA III Workshop<sup>(2)</sup>) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo 4H11[APG] reconoce un epítipo de clase III del antígeno CD34 humano (mucosialina). HLDA Workshop (HLDA III Workshop<sup>(3)</sup>) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

### Precisión

La precisión del método se determinó como una comparación del Kit CD34 QuantiFlowEx con un producto similar disponible en el mercado (kit de enumeración de células madre BD, n.º cat. 344563) mediante tinción paralela de 34 muestras de sangre o tejido analizadas con el citómetro de flujo BD FACSLyric™ y en el citómetro de flujo Sysmex XF-1600 (Tabla 3, 4) junto con otro método acreditado bien documentado mediante tinción paralela de 75 muestras de sangre

o tejido analizadas por citómetro de flujo BD FACSCanto™ II o citómetro de flujo Beckman Coulter Navios (Tabla 5, 6, 7).

Los parámetros del análisis de regresión lineal figuran en la Tabla 3-7.

**Tabla 3** Análisis de la regresión lineal para células madre CD34+ en donantes (comparación del Kit CD34 QuantiFlowEx con el kit de enumeración de células madre BD para su uso en diagnóstico in vitro (IVD) (cat. n. 344563) analizado por el citómetro de flujo BD FACSLyric™.

Comparación con el kit de enumeración de células madre BD						
BD FACSLyric™						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r <sup>2</sup>	Intervalo
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	%	34	0,9313	0,0773	0,9602	0,12 - 1,22
	células/μl	34	1,0152	-8,2612	0,9977	6 - 2137

**Tabla 4** Análisis de la regresión lineal para células madre CD34+ en donantes (comparación del Kit CD34 QuantiFlowEx con el kit de enumeración de células madre BD para su uso en diagnóstico in vitro (IVD) (n.º cat. 344563) analizado por el citómetro de flujo Sysmex XF-1600.

Comparación con el kit de enumeración de células madre BD						
Sysmex XF-1600						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r <sup>2</sup>	Intervalo
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	%	34	0,9600	0,0473	0,9572	0,22 - 1,28
	células/μl	34	1,0233	-2,3868	0,9977	22 - 5035

**Tabla 5** Análisis de la regresión lineal para células madre CD34+ en sangre periférica (comparación del Kit CD34 QuantiFlowEx con el método interno de un laboratorio clínico acreditado: un cóctel de anticuerpos conjugados en un solo color de diferentes fabricantes combinados con una solución de lisis a base de cloruro de amonio analizada por el citómetro de flujo FACSCanto™ II de BD o el citómetro de flujo Navios de Beckman Coulter).

Comparación con el método acreditado						
Sangre periférica						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r <sup>2</sup>	Intervalo
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	%	30	0,9743	-0,0005	0,9967	0,02 - 2,22
	células/μl	30	0,9757	-0,4106	0,9947	0,24 - 468

**Tabla 6** Análisis de la regresión lineal para células madre CD34+ en productos de leucaféresis (comparación del Kit CD34 QuantiFlowEx con el método interno de un laboratorio clínico acreditado: un cóctel de anticuerpos conjugados en un solo color de diferentes fabricantes combinados con una solución de lisis a base de cloruro de amonio analizada por el citómetro de flujo FACSCanto™ II de BD o el citómetro de flujo Navios de Beckman Coulter).

Comparación con el método acreditado						
Productos de leucaféresis (PBSC)						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r <sup>2</sup>	Intervalo
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	%	25	0,9999	-0,0061	0,9925	0,81 - 10,56
	células/μl	25	0,9844	45,762	0,9918	1392 - 17497

**Tabla 7** Análisis de la regresión lineal para células madre CD34+ en médula ósea (comparación del Kit CD34 QuantiFlowEx con el método interno de un laboratorio clínico acreditado: un cóctel de anticuerpos conjugados en un solo color de diferentes fabricantes combinados con una solución de lisis a base de cloruro de amonio analizada por el citómetro de flujo FACSCanto™ II de BD o el citómetro de flujo Navios de Beckman Coulter).

Comparación con el método acreditado						
Médula ósea						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r <sup>2</sup>	Intervalo
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	%	20	0,9385	0,0467	0,9954	0,24 - 3,14
	células/μl	20	1,028	-4,1351	0,9991	47 - 1708

## Linealidad

La linealidad del método se verificó en un derivado sanguíneo de «capa leucocitaria» de un donante de sangre sano enriquecido con 11 diluciones consecutivas (en serie; por duplicado) de células CD34+ (KG-1) en 1 día por 1 operador analizadas por el citómetro de flujo BD FACSCanto™. Se utilizó la regresión lineal para evaluar el valor esperado frente al valor medio recuperado en cada dilución. El rango de linealidad se indica en la Tabla 8.

**Tabla 8** Linealidad del dispositivo en BD FACSCanto™

BD FACSCanto™					
Población de interés	Unidad	Pendiente	Intersección	r <sup>2</sup>	Intervalo
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	células/μl	1,0648	4,4804	1,0000	3,64 - 2862

## Repetibilidad

La repetibilidad del ensayo se midió en diez muestras de sangre por hexaplicado. Las muestras se analizaron con el citómetro de flujo BD FACSLytic™ y el citómetro de flujo Sysmex XF-1600. Los coeficientes de variación (CV) se indican en las siguientes tablas (Tabla 9 y 10).

**Tabla 9** Repetibilidad del dispositivo en BD FACSLytic™

BD FACSLytic™					
Población de interés	Unidad	n	Promedio	SD	CV (%)
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	%	10	1,21	0,051	4,31
	células/ $\mu$ l	10	334	109	33

**Tabla 10** Repetibilidad del dispositivo en Sysmex XF-1600

Sysmex XF-1600					
Población de interés	Unidad	n	Promedio	SD	CV (%)
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	%	10	1,6	0,103	4,67
	células/ $\mu$ l	10	448	166	37

## Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo se midió en una muestra de sangre estabilizada (CD--Chex CD34, Nivel 3) en las mismas condiciones durante 15 días. Las muestras se analizaron con el citómetro de flujo BD FACSLytic™ y el citómetro de flujo Sysmex XF-1600. Los coeficientes de variación (CV) se indican en las siguientes tablas (Tabla 11 y 12).

**Tabla 11** Reproducibilidad del dispositivo en BD FACSLytic™

Reproducibilidad – BD FACSLytic™				
Población de interés	Valor medio esperado (%)	Valor medio obtenido (%)	SD	CV (%)
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	1,65	1,67	0,0004	2,42

**Tabla 12** Reproducibilidad del dispositivo en Sysmex XF-1600

Reproducibilidad - Sysmex XF-1600				
Población de interés	Valor medio esperado (%)	Valor medio obtenido (%)	SD	CV (%)
CD34 <sup>+</sup> CD45dim	1,65	1,66	0,0004	2,66

## 12. Rendimiento clínico

Los datos clínicos se recogieron en un centro clínico. El rendimiento clínico del dispositivo ED7080 se determinó mediante la comparación del Kit CD34 QuantiFlowEx con el método interno de un laboratorio clínico acreditado. Se analizaron 75 muestras, incluida sangre periférica, productos de leucaféresis y médula ósea. A partir de los datos obtenidos, se encontró una concordancia del 100 % entre los métodos en la atención posterior del paciente.

## 13. Valores previstos

El dispositivo es adecuado para la detección y enumeración de células madre hematopoyéticas viables totales y no establece ningún diagnóstico por sí mismo. La evaluación de la calidad de la muestra depende de la aplicación prevista.

Para tres tipos de muestras, los rangos de valores obtenidos del estudio clínico se presentan en la sección 11 (Rendimiento analítico), parte Precisión.

## 14. Sustancias interferentes y limitaciones

El dispositivo no es adecuado para la identificación y enumeración de células madre mesenquimales, neurales, epiteliales y cutáneas.

## 15. Referencias

- 1) Sutherland DR, et. al. The ISHAGE guidelines for CD34<sup>+</sup> cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother. 1996 Jun;5(3):213-26. doi: 10.1089/scd.1.1996.5.213.
- 2) McMichael AJ, et al. eds. Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- 3) Kishimoto T, et al. eds. Leucocyte Typing VI. New York: Garland Publishing, Inc., 1997.
- 4) Whitby A, et. al. ISHAGE protocol: are we doing it correctly? Cytometry B Clin Cytom. 2012 Jan;82(1):9-17. doi: 10.1002/cyto.b.20612. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21915992.

## 16. Marcas

BD FACSCanto™, TruCount™ y FlowJo™ son marcas registradas de Becton, Dickinson and Company, CD-Chex CD34® es una marca registrada de Streck, Navios™, y Flow-Count™ Fluorospheres son marcas comerciales registradas de Beckman Coulter.

## 17. Historial de revisiones

Versión 4, ED7080\_IFU\_v4

Se eliminó la sangre del cordón umbilical de la función Dispositivo, en la sección de materiales y equipos necesarios (capítulos 5 y 6) hubo una división para el método de plataforma única y doble, corrección de errores en la estrategia de gating, cambios en los capítulos 11, 12 y 13 (incorporación de datos analíticos y clínicos), cita añadida.

Se ha revisado la estrategia de gating para identificar las células madre CD34. La región H (células madre CD34+ verdaderas) se ha especificado totalmente.

Página 15: Corrección de la fórmula de cálculo del recuento absoluto.

## 18. Fabricante

EXBIO Praha, a.s.  
Nad Safinou II 341  
25250 Vestec  
República Checa

### Información de contacto

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

## 19. Representantes autorizados

N/A

**AVISO:** Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el dispositivo se comunicará al fabricante y a la autoridad local competente.