

exbio

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



Instrucciones de uso (ES)

Versión: ED7080_IFU_v5_ES

Fecha de emisión: 24-10-2024

Símbolos utilizados en el etiquetado del dispositivo

	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Límite de temperatura
	Marca CE Número de ID del organismo notificado		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 ⁽¹⁾.

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[®], 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™ II y BD FACSLyric™ (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 μl 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 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.

Interferencias endógenas

En la Tabla 3 se identifican las fuentes de interferencia endógenas basándose en la investigación bibliográfica.

Tabla 3 Interferencias endógenas del aparato

Interferencias endógenas	Impacto	Referencia
Albúmina	La albúmina puede interferir en altas concentraciones debido a su capacidad para unirse y liberar grandes cantidades de ligandos.	2, 3, 4
Bilirrubina (ictericia) (no conjugada)	La bilirrubina puede aumentar el fondo de fluorescencia de las células debido a su elevada autofluorescencia.	5, 6, 7
Restos celulares (después de la lisis)	Los restos celulares pueden dar lugar a recuentos celulares inexactos y reducir los anticuerpos presentes en el dispositivo.	8, 9
Eritrocitos	Lisis insuficiente; los glóbulos rojos presentes en la muestra pueden dar lugar a un recuento celular erróneo.	6
Hemoglobina	Las muestras hemolizadas pueden dar resultados erróneos.	10
Anticuerpos antimurinos humanos	El tratamiento con anticuerpos monoclonales puede dar resultados erróneos debido a su capacidad de unión a antígenos de la superficie celular.	11, 12, 13, 14, 15, 16
Inmunoglobulinas	No se pueden lavar y pueden dar lugar a un recuento erróneo de subconjuntos de	8

	linfocitos.	
Factores reumatoides	La presencia de FR interfiere con los MIA (inmunoensayos multiplex).	17
Triglicéridos	Los niveles circulantes elevados de lípidos pueden afectar al análisis por citometría de flujo de determinadas poblaciones de células sanguíneas.	18

Interferencias exógenas

Las muestras almacenadas durante más de 24 horas pueden dar resultados erróneos.

Las muestras refrigeradas pueden dar resultados erróneos.

Una preparación incorrecta de la solución de lisis eritrocitaria puede dar lugar a resultados erróneos. Siga las instrucciones del fabricante para utilizar la solución de lisis eritrocitaria.

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[®] o células de control equivalentes como control del procedimiento positivo para garantizar el rendimiento adecuado del dispositivo según lo previsto. Streck CD-Chex CD34[®] 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.
3. Pipetee 20 µl de 7-AAD en el fondo del tubo de ensayo.
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.
3. Pipetee 20 µl de 7-AAD en el fondo del tubo de ensayo.
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 CD34 QuantiFlowEx Kit 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 CD34 QuantiFlowEx Kit

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.

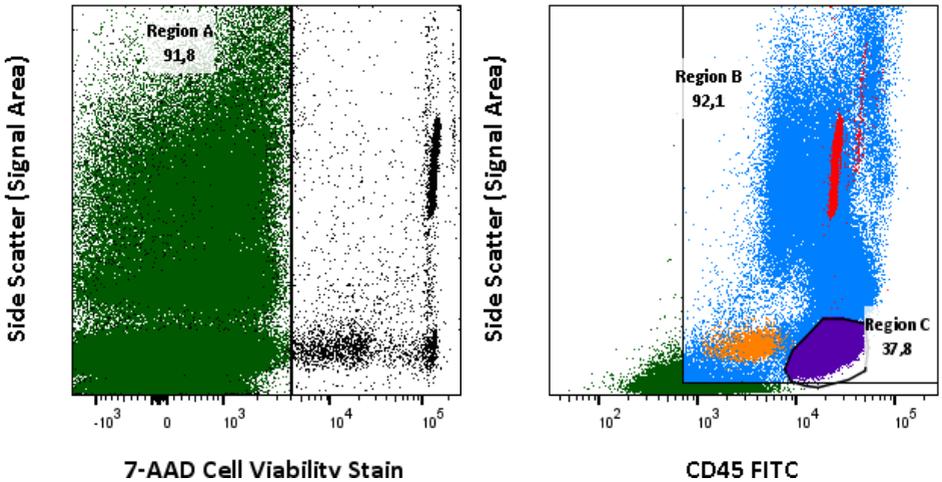
Las células madre CD34+ verdaderas también proporcionan una señal de dispersión frontal similar a las células blásticas o los linfocitos y exhiben propiedades de dispersión de luz perpendicular baja (dispersión lateral).

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

En primer lugar, visualice todos los eventos en un área de señales de dispersión lateral (SSC-A) frente a una tinción de viabilidad 7-AAD y coloque una puerta alrededor de las células vivas (7-AAD negativo) como se muestra en la región A de la imagen de la izquierda.

AVISO: cuando se utiliza un control de sangre estabilizado como, por ejemplo, Streck CD-Chex CD34[®], 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 1 La imagen de la izquierda representa la selección de la población viable. La imagen de la derecha muestra todos los eventos de las regiones A, B, C, G (derivadas de la región F) e I.

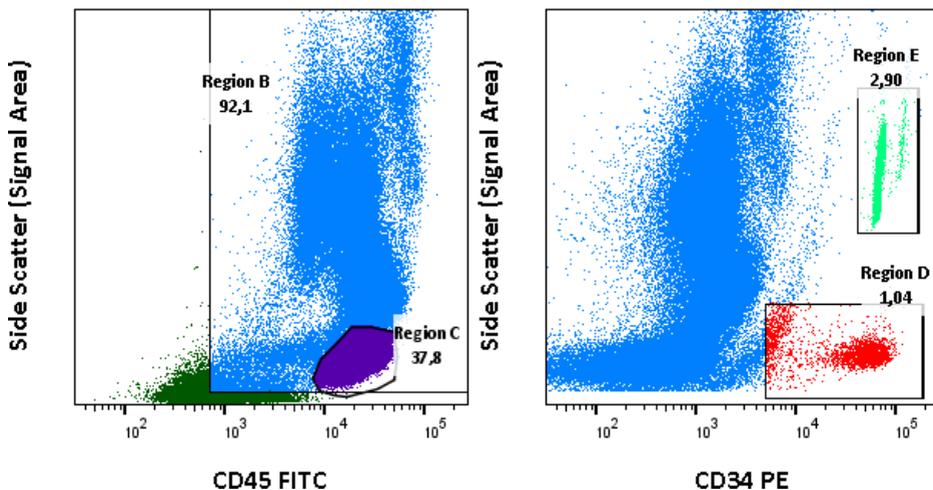


Visualice las células de la Región A en un diagrama de puntos de SSC-A frente a CD45 FITC y coloque una puerta alrededor de los **leucocitos (Región B)** y una puerta alrededor de los **linfocitos representada como Región C**.

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**, incluidas las 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 BD TruCount™ (solo para el método de plataforma única).

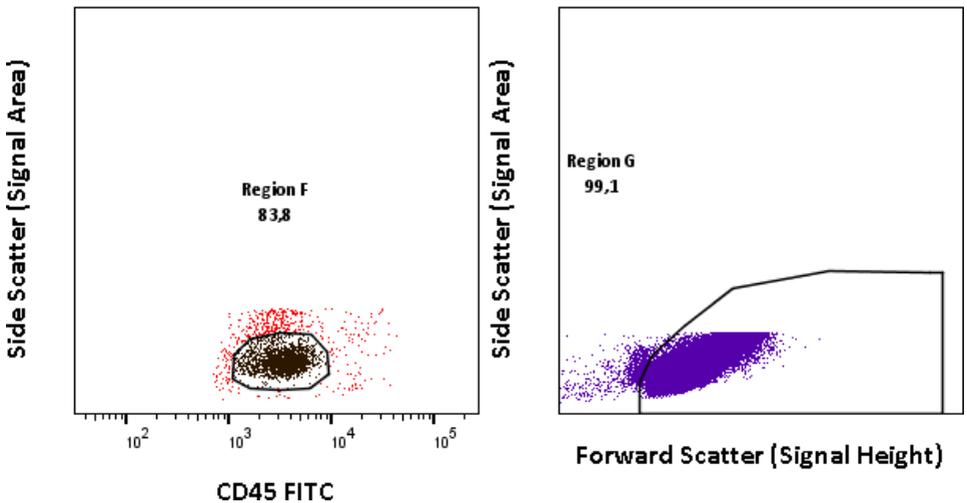
Figura 2 La imagen de la izquierda representa la selección de la población viable de leucocitos (Región B) y linfocitos (Región C). La imagen de la derecha muestra los eventos viables CD34 positivos (Región D) seleccionados de los leucocitos (Región B). Para el método de plataforma única, se puede colocar una puerta (Región E) alrededor de las microesferas fluorescentes.



Para depurar los eventos CD34 positivos de la Región D, se debe colocar una **Región F** alrededor del grupo de células positivas para CD45 dim en el gráfico de puntos SSC-A frente a CD45 FITC, con los eventos de la Región D como se muestra en la Figura 3 de la izquierda.

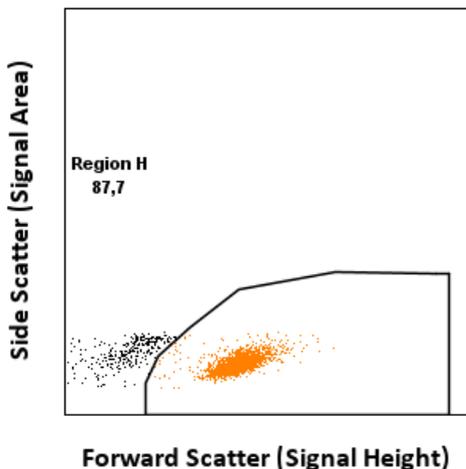
Visualización de los linfocitos CD45⁺ (Región C) en el gráfico de puntos SSC-A frente al gráfico de puntos de altura de la señal de dispersión frontal (FSC-H). Coloque una nueva puerta que delimite los linfocitos CD45⁺ de los residuos y eventos más pequeños (**Región G**) como se muestra en la Figura 3 de la derecha.

Figura 3 La imagen de la izquierda visualiza la eliminación de casos no específicos teñidos con CD34, es decir, plaquetas o agregados. La región F se utilizó para delimitar las células tintadas específicamente que son CD45^{dim}SSCs^{low} CD34⁺. La imagen de la derecha muestra la delimitación de los linfocitos CD45⁺ (Región G) de la Región C.



Copie la puerta de la **Región G** que delimita los linfocitos de la **Figura 3** (imagen derecha) y péguela en un gráfico de puntos SSC-A frente a FSC-H que contiene los eventos de la **Región F** y cree la **Región H** para diferenciar el grupo de células madre CD34⁺ de los residuos y eventos más pequeños. Las células de la Región F (Figura 3) que se encuentran dentro de la puerta de la **Región H** representan células madre CD34⁺ verdaderas.

Figura 4 La imagen representa la selección de células madre CD34⁺ verdaderas (Región H).



Solo para el método de plataforma única:

Para asegurarse de que se coloca la puerta correcta para las microesferas fluorescentes (Región E), deben visualizarse las puertas de control (Región I, J, K en las Figuras 5 y 6).

Visualice **todos los eventos** en CD34 PE frente a CD45 FITC y coloque regiones alrededor del estándar de recuento de micropartículas fluorescentes delineando micropartículas de BD TruCount™ (**Región I**) o micropartículas de Flow-Count™ de Beckman Coulter (**Región J**).

AVISO: el tamaño de las microesferas de recuento y las propiedades de fluorescencia pueden diferir según el fabricante.

Figura 5 La imagen de la izquierda representa el tamaño y las propiedades fluorescentes de las microesferas del tubo BD TruCount™ (Región I). La imagen de la derecha muestra el tamaño y las propiedades fluorescentes de las microesferas fluorescentes BC Flow-Count™ (Región J).

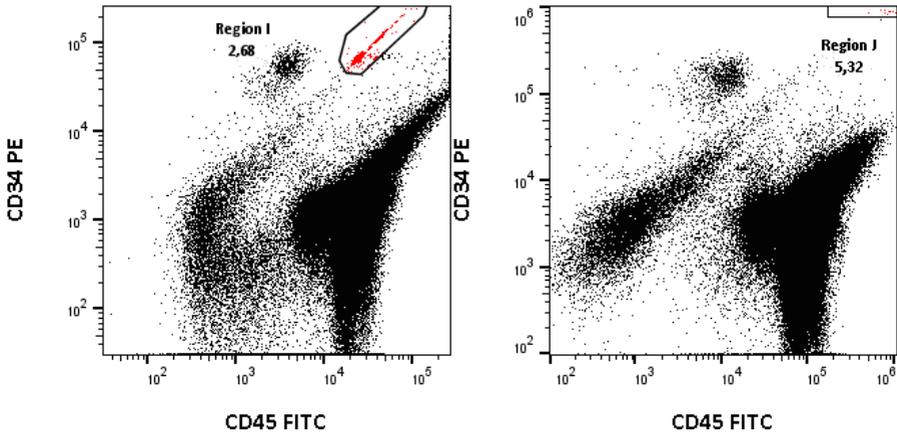
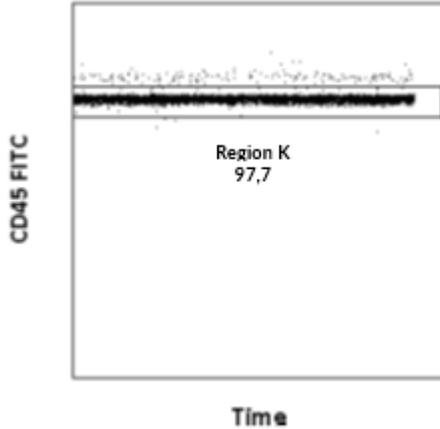


Figura 6 La imagen visualiza todas las microesferas de recuento de singletes en el tiempo (Región K).



AVISO: cualquier no homogeneidad en la Región K (alteración en la adquisición, disminución de la fluorescencia) debe ser tenida en cuenta para su revisión. La adquisición no homogénea de eventos o una adquisición que no es perpendicular al eje CD45 FITC indica problemas con la fluidica de un citómetro de flujo.

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⁺ vivas de todos los leucocitos vivos.

Enumeración del recuento absoluto de células madre CD34⁺ 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⁺ vivas de todos los leucocitos vivos:

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

<i>CD34⁺ absoluto</i>	recuento absoluto de células madre CD34 ⁺ 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⁺</i>	porcentaje de células madre CD34 ⁺ 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 ⁺ 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 la 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^+ vivas de todos los leucocitos vivos.

Enumeración del recuento absoluto de células madre CD34^+ vivas por 1 μl de material sanguíneo:

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

Enumeración del porcentaje de células madre CD34^+ vivas de todos los leucocitos vivos:

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

CD34^+ absoluto recuento absoluto de células madre CD34^+ vivas por 1 μl de material sanguíneo

Glóbulos blancos Abs. recuento absoluto de leucocitos vivos por 1 μl de material sanguíneo definido mediante un analizador hematológico

$\% \text{CD34}^+$ porcentaje de células madre CD34^+ vivas de todos los leucocitos vivos

Región B número de eventos en la Región B (leucocitos)

Región H número de células madre CD34^+ verdaderas

DF 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⁽¹⁹⁾) 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⁽²⁰⁾) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

Precisión

La exactitud del método se determinó comparando el dispositivo Kit CD34 QuantiFlowEx con el método de doble plataforma propio de un laboratorio clínico acreditado y bien documentado (cóctel de anticuerpos conjugados de un solo color

de diferentes fabricantes combinados con una solución de lisis a base de cloruro de amonio) mediante tinción paralela de 75 muestras de sangre o tejido analizadas tanto con el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II como con el citómetro de flujo Beckman Coulter Navios (tablas 4, 5 y 6). Los parámetros del análisis de regresión lineal figuran en las Tablas 4 a 6.

Tabla 4 Análisis de regresión lineal para células madre CD34+ en sangre periférica (comparación del dispositivo Kit CD34 QuantiFlowEx con el método interno de un laboratorio clínico acreditado) analizadas mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II o el citómetro de flujo Beckman Coulter Navios.

Comparación ED7080 con método acreditado						
Sangre periférica						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r²	Intervalo
CD34 ⁺ CD45dim	%	30	0,9743	-0,0005	0,9967	0,02 - 2,22
	células/ μ l	30	0,9757	-0,4106	0,9947	0,24 - 468

Tabla 5 Análisis de regresión lineal para células madre CD34+ en productos de leucoféresis (comparación del método interno del laboratorio clínico acreditado por el dispositivo Kit CD34 QuantiFlowEx) analizados mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II o el citómetro de flujo Beckman Coulter Navios.

Comparación ED7080 con método acreditado						
Productos de leucoféresis (PBSC)						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r²	Intervalo
CD34 ⁺ CD45dim	%	25	0,9999	-0,0061	0,9925	0,81 - 10,56
	células/ μ l	25	0,9844	45,762	0,9918	1392 - 17497

Tabla 6 Análisis de regresión lineal para células madre CD34+ en médula ósea (comparación del método interno del laboratorio clínico acreditado por el dispositivo Kit CD34 QuantiFlowEx) analizadas mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II o el citómetro de flujo Beckman Coulter Navios.

Comparación ED7080 con método acreditado						
Médula ósea						
Población de interés	Unidad	n	Pendiente	Intersección	r²	Intervalo
CD34 ⁺ CD45dim	%	20	0,9385	0,0467	0,9954	0,24 - 3,14
	células/ μ l	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™ II. Se utilizó la regresión lineal para evaluar el valor esperado frente al valor medio recuperado en cada dilución. El intervalo de linealidad se indica en la Tabla 7.

Tabla 7 Linealidad del dispositivo en BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
Población de interés	Unidad	Pendiente	Intersección	r ²	Intervalo
CD34 ⁺ 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 8 y 9).

Tabla 8 Repetibilidad del dispositivo en BD FACSLytic™

BD FACSLytic™					
Población de interés	Unidad	n	Intervalo de valor evaluado	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0035	7,2
	células/μl	10	8-20	1,0	7,2

Tabla 9 Repetibilidad del dispositivo en Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™					
Población de interés	Unidad	n	Intervalo de valor evaluado	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0047	9,4
	células/μl	10	7-20	1,2	9,4

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 10 y 11).

Tabla 10 Reproducibilidad del dispositivo en BD FACSLyric™

Reproducibilidad - BD FACSLyric™						
Tipo de muestra	Intervalo esperado (%)	Valor medio esperado (%)	Valor medio obtenido (%)	SD	CV (%)	Intervalo de valores medidos
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 - 1,95	1,65	1,67	0,06	3,6	1,46-1,70

Tabla 11 Reproducibilidad del dispositivo en Sysmex XF-1600™

Reproducibilidad - Sysmex XF-1600™						
Tipo de muestra	Intervalo esperado (%)	Valor medio esperado (%)	Valor medio obtenido (%)	SD	CV (%)	Intervalo de valores medidos
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 - 1,95	1,65	1,54	0,04	2,8	1,48-1,62

AVISO: Para el análisis de citometría de flujo se utilizaron los siguientes citómetros de flujo, incluida la versión de software:

BD FACSCanto™ II	BD FACSDiva Software - versión 8.0.2
BD FACSLyric™	BD FACSSuite Software - versión 1.5
Sysmex XF-1600™	IPU Software - versión 0(0.09-00)
Navios EX	Navios Ex Software v2.0

Para los recuentos celulares absolutos se utilizó el analizador de hematología con método de plataforma dual con las siguientes especificaciones:

Sysmex XN-1000™	IPU Software - versión 00-22(164)
-----------------	-----------------------------------

Para la evaluación de los datos medidos se utilizó la siguiente plataforma de análisis:

FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - versión 10.9.0

12. Rendimiento clínico

Los datos clínicos se recogieron en un centro clínico. El rendimiento clínico del dispositivo ED7080 se determinó comparando el Kit CD34 QuantiFlowEx con el método interno de un laboratorio clínico acreditado. Se analizaron 75 muestras, incluida sangre periférica, productos de leucoféresis y muestras de médula ósea. La diferencia entre los métodos fue inferior al 10 % en 67 de las 75 determinaciones, lo que significa que los resultados obtenidos por ambos métodos coincidieron en gran medida. Las diferencias relativas entre los métodos oscilaron entre -13 % y +11 %. Estos datos se compararon posteriormente mediante un análisis de regresión lineal y una evaluación de Bland-Altman de la concordancia entre métodos (diferencia relativa de recuentos), que mostró una buena concordancia entre los métodos. El valor medio de las diferencias relativas de recuento entre dos métodos es del 1 % y un error estándar del 6 %.

Las directrices para la determinación de CD34+ HSC sugieren comparar los resultados con una diferencia relativa máxima aceptable entre duplicados de hasta el 10 %⁽²¹⁾. Según estas recomendaciones, estos métodos proporcionan datos que pueden considerarse iguales entre sí.

13. Valores previstos

El dispositivo se ha diseñado para la detección y enumeración del total de células madre hematopoyéticas viables y no establece por sí mismo ningún diagnóstico en el que se pueda establecer un intervalo normal de valores.

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

14. Limitaciones

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

Las muestras con un recuento de glóbulos blancos muy elevado deben diluirse antes de la tinción en PBS para obtener un recuento de leucocitos inferior a 20×10^3 células/ μl ⁽²²⁾.

15. Referencias

- 1) Sutherland DR, et. al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother. 1996 Jun;5(3):213-26. doi: 10.1089/scd.1.1996.5.213.
- 2) Tate J, et al. Interferences in immunoassay. Clin Biochem Rev. 2004 May; 25(2):105-20.

- 3) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov;36(6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603.
- 4) Frengen J, et al. Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays. *Clinical Chemistry.* 1994 March;40(3):420-425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>.
- 5) Htun NM, 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. doi:10.1038/s41467-017-00138-x.
- 6) Lecoeur H, et al. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *Journal of Immunological Methods.* 1996;198(1):87-99. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 7) XUE Y, et al. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine.* 2022; 37(12): 1169-1173. Doi: 10.3969/j.issn.1673-8640.2022.12.013.
- 8) Higgins J, et al. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07.
- 9) Lam WK, et al. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859.
- 10) de Jonge G, et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396.
- 11) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56.
- 12) Achour L, et al. CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009;113(9): 1938-1947. doi: 10.1182/blood-2008-02-141275.
- 13) Van Caeneghem Y, et al. Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities. *Oncol Immunology.* 2017;6:3, doi: 10.1080/2162402X.2017.1283460.

- 14) Stronkhorst A, et al. CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1992;27(194):61-65, doi: 10.3109/00365529209096029.
- 15) Zinzani, PL, et al. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022;148:177-190. doi: 10.1007/s00432-021-03833-x.
- 16) Whiteman KR, et al. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small cell lung cancer in human xenograft models. *MAbs*. 2014 Mar-Apr;6(2):556-66. doi: 10.4161/mabs.27756.
- 17) Bartels EM, et al. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis*. 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071.
- 18) van Ierssel SH, et al. Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE*. 2012;7(2):e31496. doi: 10.1371/journal.pone.0031496.
- 19) McMichael AJ, et al. eds. *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- 20) Kishimoto T, et al. eds. *Leucocyte Typing VI*. New York: Garland Publishing, Inc., 1997.
- 21) 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.
- 22) Keeney M, et al. "Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*." *Cytometry* vol. 34,2 (1998): 61-70. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19980415)34:2<61::AID-CYTO1>3.0.CO;2-F.

16. Resumen sobre seguridad y funcionamiento

El resumen de seguridad y funcionamiento estará disponible en la base de datos Eudamed en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Hasta entonces, el resumen de seguridad y funcionamiento está disponible previa solicitud.

17. Uso de marcas comerciales de terceros

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, TruCount™ y FlowJo™ son marcas registradas de Becton, Dickinson and Company, Sysmex XF-1600™ es una marca registrada de Sysmex Corporation, CD-Chex CD34® es una marca registrada de Streck, Navios™, y Flow-Count™ Fluorospheres son marcas comerciales registradas de Beckman Coulter.

18. Historial de revisiones

Versión 5, ED7080_IFU_v5

Nuevo diseño de IFU conforme a los requisitos del IVDR (UE) 2017/746. Se ha añadido el número de identificación del organismo notificado. Se ha añadido el nuevo capítulo 16. Resumen sobre seguridad y funcionamiento. Se ha modificado el texto de la estrategia de gating, se han hecho recomendaciones para el gating en una sola plataforma. Aclaración del término factor de dilución. Cambios en los capítulos 11., 12., 14. y 15. (incorporación de datos analíticos y clínicos).

19. 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

20. 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.