

# exbio

## CD34 QuantiFlowEx Kit 50 test | N. Cat. ED7080



### Istruzioni per l'uso (IT)

Versione: ED7080\_IFU\_v4\_IT

Data di pubblicazione: 27-07-2023

#### Simboli utilizzati nell'etichettatura del dispositivo

|  |   |  |  |
|--|---|--|--|
|  | Dispositivo medico-diagnostico in vitro     |  | Limite di temperatura                                    |
|  | Marcatura CE di dichiarazione di conformità |  | Tenere lontano dalla luce del sole                       |
|  | Produttore                                  |  | Tenere all'asciutto<br>Conservare al riparo dall'umidità |
|  | Codice Unico di Identificazione             |  | Precauzioni  |
|  | Consultare le istruzioni per l'uso          |  | Soluzione concentrata (10x)                              |
|  | Contenuto sufficiente per <n> test          |  | Contenuti  |
|  | Numero di catalogo                          |  | Marchio UKCA   |
|  | Codice di lotto                             |  |  |
|  | Data di scadenza                            |  |  |

## 1. Uso previsto

CD34 QuantiFlowEx Kit è utilizzato per l'individuazione e la quantificazione di cellule staminali ematopoietiche vitali totali dai leucociti vitali totali nel sangue e nei campioni di tessuti umani tramite citofluorimetria.

### **Cosa viene rilevato e/o misurato**

Il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit individua e misura le percentuali relative e le conte assolute di cellule staminali ematopoietiche vitali umane (CD34+CD45dim).

### **Funzione del dispositivo**

Il dispositivo è utilizzato per monitorare la conta delle cellule staminali ematopoietiche nel sangue periferico, nel midollo osseo e nel prodotto di leucoaferesi.

### **Contesto di stato fisiologico o patologico**

La quantificazione accurata della conta delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) in sangue umano e in campioni di tessuti umani o innesti da trapiantare è necessaria per la gestione del paziente o il trattamento degli innesti <sup>(1)</sup>.

### **Tipo di test**

Non automatizzato

Quantitativo

### **Tipo di campione richiesto**

Sangue periferico normale, sangue periferico mobilizzato, prodotto/i di leucoaferesi o midollo osseo.

### **Popolazione da sottoporre al test**

Non destinato a una popolazione specifica.

## 2. Utilizzatore previsto

Il solo uso previsto del dispositivo è quello professionale in laboratorio. Il dispositivo non deve essere utilizzato per analisi vicino al paziente (near-patient testing) o per l'autoesame.

### **Requisiti di qualificazione**

L'utilizzatore previsto deve possedere competenze all'avanguardia nell'analisi con citofluorimetria delle cellule umane, nelle tecniche standard di laboratorio, come le capacità di pipettaggio, la corretta e sicura manipolazione dei campioni provenienti dall'organismo umano.

L'utilizzatore previsto deve soddisfare la norma UNI EN ISO 15189 o altre norme nazionali, laddove previste.

### 3. Principio del test

Il principio del test si basa sull'individuazione di anticorpi monoclonali che si legano a una specifica molecola (antigene) espressa da determinate cellule ematiche negli esseri umani. Gli anticorpi monoclonali utilizzati nel test sono coniugati con diversi fluorocromi che, durante l'acquisizione di un campione di sangue colorato con anticorpi, vengono eccitati da un fascio laser proveniente da un citofluorimetro. La conseguente fluorescenza (emissione di luce) da ciascun fluorocromo presente su una cellula ematica acquisita è raccolta e analizzata dallo strumento. L'intensità della fluorescenza è direttamente proporzionale alla densità di espressione dell'antigene in una cellula che permette la separazione di diverse sottopopolazioni cellulari.

7-AAD è un colorante che modifica la permeabilità di membrana cellulare che è escluso dalle cellule vitali e si lega al DNA nelle cellule non vitali. Le differenze nell'intensità della fluorescenza delle cellule permettono di escludere le cellule non vitali dall'analisi.

### 4. Reagenti forniti

#### Contenuti

Il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit è sufficiente per 50 test ed è fornito con i seguenti reagenti:

**Staining Reagent** (ED7080-1; 1 flaconcino) contenente 1 ml di combinazione premiscelata di anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi CD45 FITC e CD34 PE, diluita a concentrazioni ottimali in una soluzione salina stabilizzante tamponata con fosfato (PBS) contenente 15 mM di sodio azide; vedere Tabella 1.

**7-AAD** (ED7080-2; 1 flaconcino) contenente 1 ml di colorante della vitalità cellulare 7-amminoactinomicina D (7-AAD), diluito a una concentrazione ottimale in una soluzione salina stabilizzante tamponata con fosfato (PBS) contenente 15mM di sodio azide.

**Lysing Solution** (ED7080-3; 1 flacone) contenente 15 ml di soluzione tamponata concentrata (10X) a base di cloruro di ammonio priva di fissativi.

#### Composizione

**Tabella 1** Descrizione e concentrazioni dei principi attivi

| Antigene | Fluorocromo | Clone      | Isotipo | Concentrazione (µg/ml) |
|----------|-------------|------------|---------|------------------------|
| CD45     | FITC        | MEM-28     | IgG1    | 30                     |
| CD34     | PE          | 4H11 [APG] | IgG1    | 35                     |

## 5. Materiali necessari ma non forniti

### Sia per il metodo a piattaforma singola sia per quello a piattaforma doppia

Provette a fondo tondo (12 x 75 mm)

Acqua deionizzata (di grado reagente)

Cellule di controllo procedurale (Streck CD-Chex CD34<sup>®</sup>, cellule di controllo CD34 – 3 livelli, n. di cat. 213337, 213347, 213383 o cellule di controllo equivalenti che possono essere sottoposte a lisi con conta predefinita di HSC CD34)

### Solo per il metodo a piattaforma singola

Standard per la conta di cellule fluorescenti

- da utilizzare con citometri Becton Dickinson
  - o BD Trucount™ Tubes
- da utilizzare con citometri Beckman Coulter
  - o Beckman Coulter Flow-Count™ Fluorospheres

## 6. Attrezzatura necessaria

### Sia per il metodo a piattaforma singola sia per quello a piattaforma doppia

Pipetta automatica con puntali monouso (20 – 100 µl) per il pipettaggio del campione e dei reagenti

Dosatore per liquidi o pipetta con puntali monouso (2 ml) per il dosaggio della soluzione per la lisi degli eritrociti

Sfere di conteggio (Trucount™ Tubes (BD Biosciences; n. di rif. 663028), FlowCount Fluorospheres (Beckman Coulter; n di rif. 7547053)

Agitatore vortex

Citofluorimetro con un laser di eccitazione (488 nm), rilevatori del light scatter, filtri ottici e rilevatori di emissioni idonei alla raccolta dei segnali dai fluorocromi forniti nella Tabella 2.

**Tabella 2** Caratteristiche spettrali dei fluorocromi utilizzati dal dispositivo

| Fluorocromo | Eccitazione [nm] | Emissione [nm] |
|-------------|------------------|----------------|
| FITC        | 488              | 525            |
| PE          | 488              | 576            |
| 7-AAD       | 488              | 670            |

**AVVISO:** Il dispositivo è stato testato con i citofluorimetri BD FACSCanto™ (BD Biosciences), Navios (Beckman Coulter) e XF-1600 (Sysmex).

### **Solo per il metodo a piattaforma doppia**

Analizzatore ematologico (per le conte cellulari assolute) in grado di eseguire il conteggio dei leucociti (WBC) e dei linfociti per  $\mu\text{l}$  di campione.

## **7. Conservazione e manipolazione**

Conservare a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C.

Evitare l'esposizione prolungata alla luce.

Non congelare.

Consultare il paragrafo 10 Procedura (preparazione dei reagenti) per informazioni sulla stabilità durante l'utilizzo e sul periodo di validità dopo la prima apertura, nonché per conoscere le condizioni di conservazione e la stabilità delle soluzioni di lavoro (se presenti).

## **8. Avvertenze, precauzioni e limitazioni d'impiego**

### **Classificazione dei pericoli GHS**

Consultare la Scheda di sicurezza (SDS) disponibile nella pagina di prodotto su [www.exbio.cz](http://www.exbio.cz) per conoscere tutte le informazioni sui rischi causati dalle sostanze chimiche e dalle miscele contenute nel prodotto e in che modo manipolarle e smaltirle.

### **Rischio biologico**

I campioni biologici e i campioni ematici umani e tutti i materiali che entrano in contatto con tali sostanze e miscele sono sempre considerati materiali infettivi.

Utilizzare dispositivi di protezione individuale e di sicurezza per evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose.

Rispettare tutte le leggi, i regolamenti e le procedure in vigore sulla manipolazione e lo smaltimento dei materiali infettivi.

### **Limiti di utilizzo**

I reagenti forniti appaiono normalmente come liquidi trasparenti. Non utilizzare il reagente se si osservano alterazioni nell'aspetto, ad esempio torbidità o segni di precipitazione.

### **Limitazione d'impiego**

Non utilizzare dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta dei prodotti.

## 9. Campione

Utilizzare sangue o materiale tissutale raccolto nel contenitore per campioni classificato come dispositivo medico, con anticoagulanti EDTA, eparina o ACD (destrosio citrato).

Utilizzando il dispositivo è possibile eseguire l'analisi del seguente campione: sangue periferico normale e mobilizzato, prodotti di leucoaferesi e midollo osseo.

**AVVISO:** Per l'analisi a piattaforma doppia determinare la conta leucocitaria assoluta nel campione raccolto con un analizzatore ematologico. Il solo dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit non fornisce la quantificazione delle conte cellulari assolute.

Processare il campione entro e non oltre 24 ore dopo la raccolta.

## 10. Procedura

### Preparazione dei reagenti forniti

#### Staining Reagent e 7-AAD

Non è necessaria la preparazione del reagente.

Prima dell'uso, portare il reagente a temperatura ambiente. Mantenere asciutto il contenitore primario del dispositivo.

Utilizzare il reagente direttamente dal contenitore primario originale.

Dopo la prima apertura, il reagente mantiene le caratteristiche prestazionali fino alla data di scadenza purché sia conservato alle condizioni indicate nel contenitore primario originale.

**ATTENZIONE:** Non diluire il reagente.

#### Lysing Solution

Diluire la soluzione per la lisi degli eritrociti concentrata (10X) nella soluzione di lisi di lavoro (1X) con acqua deionizzata.

**ATTENZIONE:** La soluzione di lisi di lavoro (1X) si mantiene stabile per **1 giorno solo**. Preparare una soluzione di lisi di lavoro nuova (1X) ogni giorno di misurazione mescolando 1 parte di soluzione di lisi concentrata (10X) con 9 parti di acqua deionizzata e conservare nel dosatore per liquidi o in un contenitore chiuso a temperatura ambiente.

### Preparazione dei materiali necessari ma non forniti

Per la preparazione e l'utilizzo di standard per la conta di cellule fluorescenti, seguire le istruzioni del produttore.

## Controllo qualità

Per garantire le corrette prestazioni previste del dispositivo, utilizzare Use Streck CD-Chex CD34® o cellule di controllo equivalenti come controllo procedurale positivo. Streck CD-Chex CD34® fornisce valori consolidati della percentuale positiva e delle conte assolute di HSC CD34+.

Colorare le cellule di controllo utilizzando CD34 QuantiFlowEx Kit in base al trattamento del campione specificato nelle istruzioni per l'uso. Verificare che i risultati ottenuti (% di cellule positive) rientrino nell'intervallo previsto indicato per il lotto di cellule di controllo utilizzato.

## Colorazione del campione - metodo a piattaforma singola

1. Per ciascun campione, etichettare una provetta a fondo tondo da 12 × 75 mm con il numero di identificazione corrispondente.

**AVVISO:** Utilizzare BD Trucount™ Tube come provetta per test per la conta assoluta delle cellule staminali CD34.

2. Pipettare 20 µl di reagente per la colorazione sul fondo della provetta da 12 x 75 mm.
3. Pipettare 20 µl di 7-AAD sul fondo della provetta da 12 x 75 mm.
4. Pipettare 100 µl di campione ben mescolato sul fondo della provetta utilizzando la tecnica di pipettaggio inverso.

**ATTENZIONE:** Un pipettaggio eseguito con accuratezza è decisivo per la quantificazione della conta assoluta delle cellule staminali CD34+. Pertanto, deve essere impiegata una tecnica di pipettaggio inverso utilizzando una pipetta automatica a spostamento d'aria.

Per aspirare un campione con pipettaggio inverso, premere lo stantuffo della pipetta fino alla 2ª posizione di arresto e aspirare il campione. In seguito posizionare il puntale della pipetta contenente il campione di sangue vicino al fondo della provetta e premere lo stantuffo della pipetta fino alla 1ª posizione di arresto per erogare il campione.

Evitare di pipettare il sangue sul lato della provetta. Se uno striscio o una gocciolina di sangue rimane sul lato della provetta, è possibile che non si colori con il reagente o che gli eritrociti non siano lisi e quindi il risultato del test non sia valido.

5. Agitare con vortex e incubare la provetta per 20-30 minuti al buio a temperatura ambiente.
6. Aggiungere 2 ml di soluzione di lisi di lavoro (1X) alla provetta del test.
7. Agitare con vortex e incubare la provetta per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.

8. Se non è stata utilizzata BD Trucount™ Tube come provetta da test, aggiungere 100 µl di Flow Count™ Fluorospheres utilizzando la tecnica di pipettaggio inverso. Seguire le istruzioni del produttore.
9. Acquisire immediatamente il campione colorato sul citofluorimetro. Se il campione colorato non è acquisito immediatamente, tappare la provetta del test, conservarlo al buio a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e analizzarlo entro 2 ore.

**ATTENZIONE:** Agitare con vortex il campione colorato immediatamente prima dell'acquisizione nel citofluorimetro per evitare la formazione di aggregati.

### **Colorazione del campione – metodo a piattaforma doppia**

**ATTENZIONE:** Prima del trattamento del campione, determinare la conta assoluta delle cellule leucocitarie nel campione raccolto con un analizzatore ematologico.

1. Per ciascun campione, etichettare una provetta a fondo tondo da 12 × 75 mm con il numero di identificazione corrispondente.
2. Pipettare 20 µl di reagente per la colorazione sul fondo della provetta da 12 x 75 mm.
3. Pipettare 20 µl di 7-AAD sul fondo della provetta da 12 x 75 mm.
4. Pipettare 100 µl di campione ben mescolato sul fondo della provetta utilizzando la tecnica di pipettaggio inverso.
5. Agitare con vortex e incubare la provetta per 20-30 minuti al buio a temperatura ambiente.
6. Aggiungere 2 ml di soluzione di lisi di lavoro (1X) alla provetta del test.
7. Agitare con vortex e incubare la provetta per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.
8. Acquisire immediatamente il campione colorato sul citofluorimetro. Se il campione colorato non è acquisito immediatamente, tappare la provetta del test, conservarlo al buio a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e analizzarlo entro 2 ore.

**ATTENZIONE:** Agitare con vortex il campione colorato immediatamente prima dell'acquisizione nel citofluorimetro per evitare la formazione di aggregati.

### **Analisi citofluorimetrica**

Il citofluorimetro selezionato per l'uso con il dispositivo CD34 QuantiFlowEx deve essere calibrato abitualmente utilizzando microsfere fluorescenti per garantire la sensibilità stabile dei rilevatori in base alle istruzioni del produttore del



citofluorimetro.

In caso di manutenzione inadeguata, il citofluorimetro può produrre risultati falsi. Consultare le specifiche del citometro del produttore relative ai laser e ai rilevatori di fluorescenza in base alle caratteristiche di eccitazione ed emissione dei fluorocromi nel paragrafo 6 (Attrezzatura necessaria).

Prima dell'analisi del campione colorato, impostare la tensione dei rilevatori di fluorescenza interessati. La tensione di un rilevatore fotomoltiplicatore (PMT) deve essere sufficientemente alta da permettere che un minimo di eventi colorati negativamente interferisca con il canale 0 sull'asse di fluorescenza. Inoltre il rilevatore PMT non deve superare i valori in cui gli eventi positivi sono premuti sull'asse destro.

In funzione del campione, acquisire almeno 300.000 – 1.000.000 di eventi per provetta.

Acquisire sempre i parametri di light scatter delle cellule: Forward Angle Light Scatter (sia segnale di Area che segnale di Altezza) e Side (ortogonale) Light Scatter (sia segnale di Area che segnale di Altezza).

Per il metodo a **piattaforma singola**: per la raccolta dei dati, impostare la soglia di fluorescenza sul rilevatore FITC invece che sulla dimensione dell'evento. La soglia sul Forward Scatter (dimensione dell'evento) può escludere dall'analisi dello standard di conta eventi di microparticelle che influenzerebbero negativamente la quantificazione della percentuale di cellule staminali CD34+.

Per il metodo a **piattaforma doppia**: impostare la soglia sul Forward Scatter.

Compensare i segnali di fluorescenza tra i rilevatori prima o dopo l'acquisizione dei dati. I dati possono essere interpretati in modo errato se i segnali di fluorescenza non sono compensati correttamente o se i gate sono posizionati in modo impreciso.

**AVVISO:** I campioni per i quali si prevede una vitalità cellulare di piccola entità devono essere utilizzati per la preparazione del controllo di compensazione con 7-AAD, ad es. cellule ematiche trattate con una soluzione di lisi a base di formaldeide. I campioni con elevata vitalità cellulare forniscono quantità esigue di cellule morte. Una conta esigua di cellule morte può influenzare negativamente l'intensità media della fluorescenza di 7-AAD delle cellule morte e può produrre una compensazione inadeguata.

Per l'analisi dei dati misurati, è possibile utilizzare il software di citometria sviluppato dal produttore o il software dedicato all'analisi offline dei dati di citometria (ad esempio FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

## **Analisi dei dati del campione colorato con CD34 QuantiFlowEx Kit**

Analizzare i dati misurati e compensati utilizzando il software adeguato. Per la quantificazione della percentuale di cellule staminali CD34+ vitali deve essere impiegato il protocollo di gating della International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (Fig. 1-5).

Utilizzando 5 parametri (2 parametri di light scatter e 3 parametri fluorescenti), si individuano le cellule staminali ematopoietiche CD34+ tramite una combinazione di gating sequenziale e boolean gating in base alle loro proprietà.

Le reali cellule staminali CD34+ esprimono l'antigene CD34 e CD45, tuttavia l'espressione di CD45 è simile a quella dei blasti. L'intensità della colorazione è individuabile, ma è inferiore rispetto ai linfociti, per esempio.

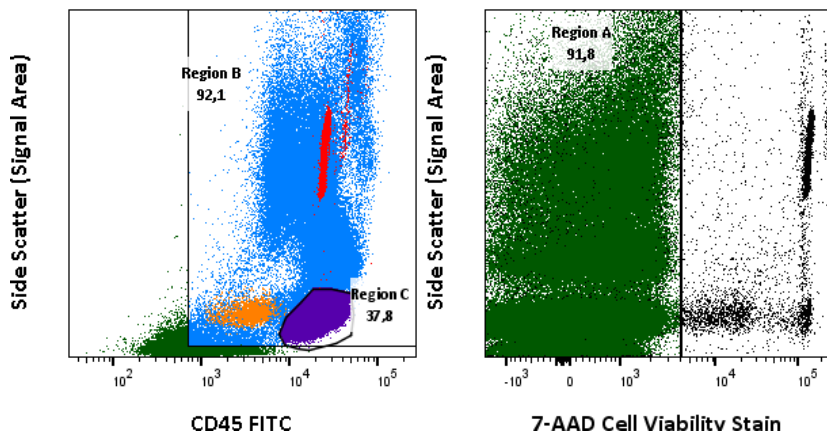
Le reali cellule staminali CD34+ forniscono anche un segnale di forward angle light scatter simile ai blasti o ai linfociti e mostrano proprietà esigue di light scatter ortogonale (side scatter).

Le Figure 1-5 mostrano la sequenza di gating logico che assicura l'individuazione accurata di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali per una quantificazione accurata delle percentuali.

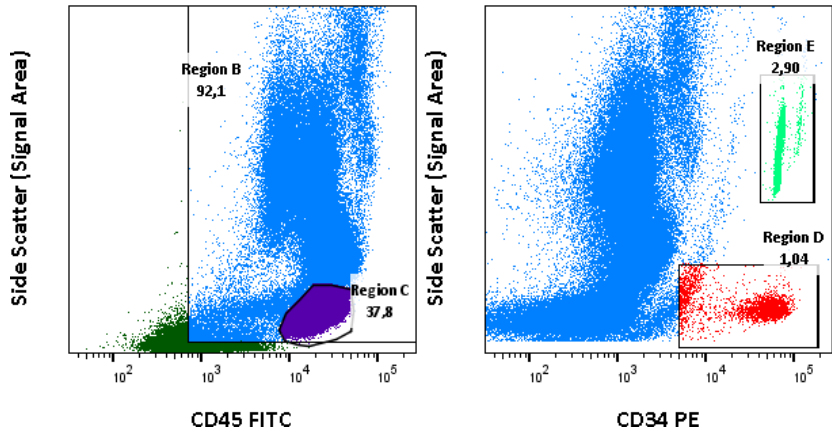
**Figura 1** L'immagine sulla sinistra rappresenta tutti gli eventi all'interno del gate delle Regioni A, B, C, G (derivanti dalla Regione F) e I.

Visualizzare innanzitutto tutti gli eventi in un dot plot Side Scatter Signal Area (SSC-A) vs colorazione della vitalità con 7-AAD e posizionare un gate attorno alle cellule vitali (7-AAD negative) come mostrato nella Regione A dell'immagine a destra.

**Nota:** Quando si utilizza un controllo ematico stabilizzato come ad es. Streck CD-Chex CD34<sup>®</sup>, è vivamente consigliato di controllare la Regione A della vitalità e se necessario riposizionare la regione, perché il sangue stabilizzato contiene formaldeide che penetra nella membrana cellulare e questo fenomeno comporta una colorazione positiva del colorante della vitalità 7-AAD.

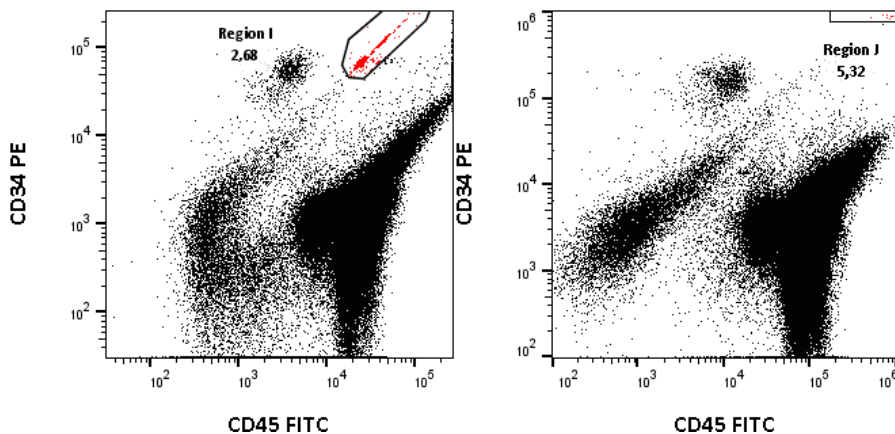


**Figura 2** Visualizzare le cellule dalla Regione A in un dot plot SSC-A vs CD45 FITC e posizionare un gate intorno ai **leucociti (Regione B)** e un gate intorno ai **linfociti** rappresentati nella **Regione C**. Spostare le cellule dalla Regione B in un dot plot SSC-A vs CD34 PE e posizionare un gate intorno agli **eventi positivi CD34 (Regione D)**. L'immagine sulla destra mostra tutti gli eventi, incluse le microparticelle fluorescenti della **Regione I** indicate nella **Regione E**. La Regione E indica le proprietà ottiche e fluorescenti dello standard di conteggio delle microparticelle fluorescenti nella BD Trucount™ Tube.



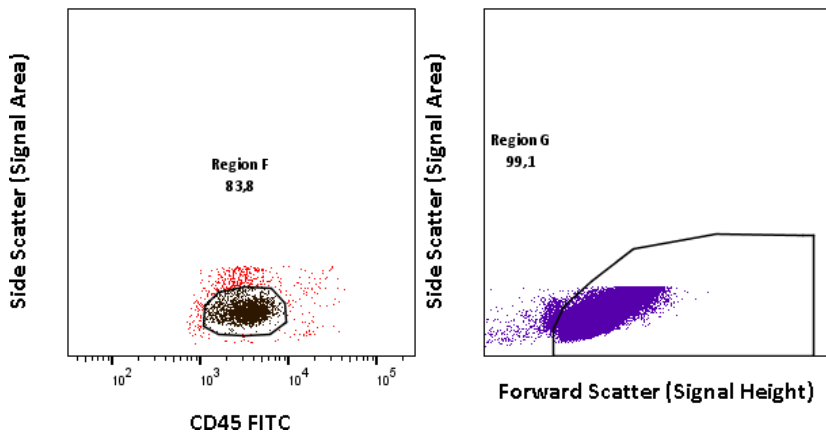
**Figura 3** Visualizzare **tutti gli eventi** in CD34 PE vs. CD45 FITC e posizionare le regioni intorno allo standard di conteggio che delinea le microparticelle fluorescenti di BD Trucount™ acquisite con il citometro BD FACSCanto™ (**Regione I**) e le microparticelle di Beckman Coulter Flow-Count™ acquisite con un citometro Beckman Coulter Navios™ (**Regione J**).

**Nota 1:** Le dimensioni delle sfere di conteggio e le proprietà di fluorescenza possono differire tra un produttore e l'altro. La **Fig. 3** rappresenta le dimensioni e le proprietà fluorescenti delle sfere presenti in BD Trucount™ Tube o Beckman Coulter Flow-Count™ Fluorospheres.

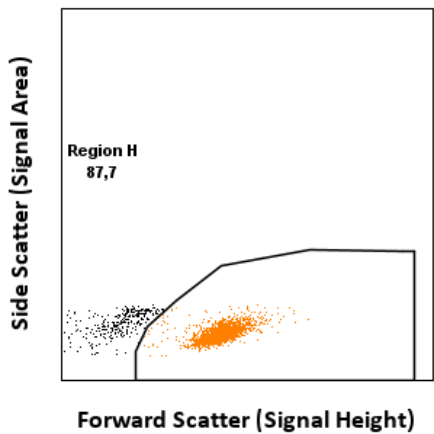


**Figura 4** Purificare gli eventi positivi CD34 della Regione D posizionando una **Regione F** attorno al cluster di cellule CD45 positive scuro in un dot plot SSC-A vs CD45 FITC con gli eventi della Regione D come illustrato dall'immagine sulla sinistra.

Mostra i linfociti CD45+ (Regione C) nel grafico a punti SSC-A vs Forward Scatter Signal Height (FSC-H). Posiziona un nuovo gate che delimita i linfociti CD45+ dagli eventi più piccoli e dai detriti (**Regione G**), come mostrato nell'immagine a destra.



**Figura 5** Copia il gate della **Regione G** che delinea i linfociti dalla **Fig. 4** (immagine a destra) e incolla la regione (**Regione H**) nel grafico a punti SSC-A vs FSC-H contenente gli eventi della **Regione F**, per differenziare il cluster di cellule staminali CD34+ dagli eventi più piccoli e dai detriti. Le cellule della Regione F (Figura 4) trovate all'interno del gate della **Regione H** rappresentano vere cellule staminali CD34+.



### **Calcolo e interpretazione dei risultati analitici – metodo a piattaforma singola**

Usare le equazioni di seguito per la quantificazione delle percentuali e delle conte assolute di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali da tutti i leucociti vitali.

*Quantificazione della conta assoluta di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali per 1 µl di materiale ematico:*

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

*Quantificazione della conta assoluta di leucociti vitali per 1 µl di materiale ematico:*

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

*Quantificazione della percentuale di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali da tutti i leucociti vitali:*

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

*Ass. CD34<sup>+</sup>*    conta assoluta di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali per 1 µl di materiale ematico

*Ass. WBC*        conta assoluta di leucociti vitali per 1 µl di materiale ematico

*% di CD34<sup>+</sup>*    percentuale di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali da tutti i leucociti vivi

*Regione B*      numero di eventi nella Regione B (leucociti)

*Regione H*      cellule staminali CD34<sup>+</sup> reali

*Regione E*      numero di eventi nella Regione E (microparticelle)

*P*                numero di microparticelle per test (presenti nella provetta) indicato dal produttore delle microparticelle

*V*                volume del campione – 100 µl

*DF*              fattore di diluizione (diluizione del campione prima della colorazione); DF = 2 significa che 1 parte di materiale ematico (100 µl) è stata diluita utilizzando 1 parte di PBS contenente BSA allo 0,5% (100 µl)

### **Calcolo e interpretazione dei risultati analitici – metodo a piattaforma doppia**

Utilizzare l'analizzatore ematologico per definire la conta leucocitaria per µl di campione. Consultare le istruzioni del produttore dell'analizzatore ematologico.

Usare le equazioni di seguito per la quantificazione delle percentuali e delle conte assolute di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali da tutti i leucociti vitali.



Quantificazione della conta assoluta di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali per 1 µl di materiale ematico:

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

Quantificazione della percentuale di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali da tutti i leucociti vitali:

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

*Ass. CD34<sup>+</sup>* conta assoluta di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali per 1 µl di materiale ematico

*Ass. WBC* conta assoluta di leucociti vitali per 1 µl di materiale ematico definita utilizzando l'analizzatore ematologico

*% di CD34<sup>+</sup>* percentuale di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vitali da tutti i leucociti vivi

*Regione B* numero di eventi nella Regione B (leucociti)

*Regione H* numero di cellule staminali CD34<sup>+</sup> reali

*DF* fattore di diluizione (diluizione del campione prima della colorazione); DF = 2 significa che 1 parte di materiale ematico (100 µl) è stata diluita utilizzando 1 parte di PBS contenente BSA allo 0,5% (100 µl)

## 11. Prestazione analitiche

### Specificità

L'anticorpo MEM-28 riconosce tutte le isoforme leucocitarie dell'antigene umano CD45 (proteina tirosina fosfatasi, recettore di tipo C). La specificità dell'anticorpo è stata confermata dal workshop HLDA (III workshop HLDA <sup>(2)</sup>).

L'anticorpo 4H11[APG] riconosce l'epitopo di classe III dell'antigene CD34 umano (Mucosialin). La specificità dell'anticorpo è stata confermata dal workshop HLDA (VI workshop HLDA <sup>(3)</sup>).

### Accuratezza

L'accuratezza del metodo è stata determinata confrontando il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit con un prodotto simile disponibile sul mercato (BD Stem Cell Enumeration Kit, n. di cat. 344563) attraverso la colorazione in parallelo di 34 campioni ematici o tissutali analizzati sia con il citofluorimetro BD FACSLyric™ che con il citofluorimetro Sysmex XF-1600 (tabella 3, 4) insieme a un altro metodo accreditato ampiamente documentato tramite la colorazione in parallelo di 75 campioni ematici o di tessuto analizzati con il citofluorimetro BD FACSCanto™ II o il citofluorimetro Beckman Coulter Navios (tabella 5, 6, 7).

I parametri dell'analisi di regressione lineare sono presentati nella Tabella 3-7.

**Tabella 3** Analisi di regressione lineare delle cellule staminali CD34+ in donatori (confronto tra il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit con il prodotto per IVD BD Stem Cell Enumeration Kit (n. di cat. 344563) analizzate con il citofluorimetro BD FACSLyric™.

| Confronto con BD Stem Cell Enumeration Kit |            |    |          |            |                |             |
|--|------------|----|----------|------------|----------------|-------------|
| BD FACSLyric™                              |            |    |          |            |                |             |
| Popolazione target                         | Unità      | n  | Pendenza | Intercetta | r <sup>2</sup> | Intervallo  |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim                  | %          | 34 | 0,9313   | 0,0773     | 0,9602         | 0,12 - 1,22 |
|  | cellule/μl | 34 | 1,0152   | -8,2612    | 0,9977         | 6 - 2137    |

**Tabella 4** Analisi di regressione lineare delle cellule staminali CD34+ in donatori (confronto tra il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit con il prodotto per IVD BD Stem Cell Enumeration Kit (n. di cat. 344563) analizzate con il citofluorimetro Sysmex XF-1600.

| Confronto con BD Stem Cell Enumeration Kit |            |    |          |            |                |             |
|--|------------|----|----------|------------|----------------|-------------|
| Sysmex XF-1600                             |            |    |          |            |                |             |
| Popolazione target                         | Unità      | n  | Pendenza | Intercetta | r <sup>2</sup> | Intervallo  |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim                  | %          | 34 | 0,9600   | 0,0473     | 0,9572         | 0,22 - 1,28 |
|  | cellule/μl | 34 | 1,0233   | -2,3868    | 0,9977         | 22 - 5035   |

**Tabella 5** Analisi di regressione lineare delle cellule staminali CD34+ in sangue periferico (confronto tra il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit con il metodo interno accreditato di un laboratorio clinico, ossia un cocktail di anticorpi coniugati a un solo colore di produttori diversi combinati con una soluzione di lisi a base di cloruro di ammonio analizzate con il citofluorimetro BD FACSCanto™ II o il citofluorimetro Beckman Coulter Navios.

| Confronto con il metodo accreditato |            |    |          |            |                |             |
|-------------------------------------|------------|----|----------|------------|----------------|-------------|
| Sangue periferico                   |            |    |          |            |                |             |
| Popolazione target                  | Unità      | n  | Pendenza | Intercetta | r <sup>2</sup> | Intervallo  |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim           | %          | 30 | 0,9743   | -0,0005    | 0,9967         | 0,02 - 2,22 |
|                                     | cellule/μl | 30 | 0,9757   | -0,4106    | 0,9947         | 0,24 - 468  |

**Tabella 6** Analisi di regressione lineare delle cellule staminali CD34+ in prodotti di leucaferesi (confronto tra il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit con il metodo interno accreditato di un laboratorio clinico, ossia un cocktail di anticorpi coniugati a un solo colore di produttori diversi combinati con una soluzione di lisi a base di cloruro di ammonio analizzate con il citofluorimetro BD FACSCanto™ II o il citofluorimetro Beckman Coulter Navios.

| Confronto con il metodo accreditato |            |    |          |            |                |              |
|-------------------------------------|------------|----|----------|------------|----------------|--------------|
| Prodotti di leucaferesi (PBSC)      |            |    |          |            |                |              |
| Popolazione target                  | Unità      | n  | Pendenza | Intercetta | r <sup>2</sup> | Intervallo   |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim           | %          | 25 | 0,9999   | -0,0061    | 0,9925         | 0,81 - 10,56 |
|                                     | cellule/μl | 25 | 0,9844   | 45762      | 0,9918         | 1392 - 17497 |

**Tabella 7** Analisi di regressione lineare delle cellule staminali CD34+ in midollo osseo (confronto tra il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit con il metodo interno accreditato di un laboratorio clinico, ossia un cocktail di anticorpi coniugati a un solo colore di produttori diversi combinati con una soluzione di lisi a base di cloruro di ammonio analizzate con il citofluorimetro BD FACSCanto™ II o il citofluorimetro Beckman Coulter Navios.

| Confronto con il metodo accreditato |            |    |          |            |                |             |
|-------------------------------------|------------|----|----------|------------|----------------|-------------|
| Midollo osseo                       |            |    |          |            |                |             |
| Popolazione target                  | Unità      | n  | Pendenza | Intercetta | r <sup>2</sup> | Intervallo  |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim           | %          | 20 | 0,9385   | 0,0467     | 0,9954         | 0,24 - 3,14 |
|                                     | cellule/μl | 20 | 1028     | -4,1351    | 0,9991         | 47 - 1708   |

## Linearità

La linearità del metodo è stata verificata su un derivato di sangue “buffy coat” di donatore sano a cui sono state aggiunte, in un giorno da un operatore, 11 diluizioni consecutive (seriali; doppie) di cellule CD34+ (KG-1) e analizzate dal citofluorimetro BD FACSCanto™. Per la valutazione del valore previsto rispetto al valore medio recuperato in ciascuna diluizione è stata impiegata la regressione lineare. L'intervallo di linearità è indicato nella tabella 8.

**Tabella 8** Linearità del dispositivo su BD FACSCanto™

| BD FACSCanto™             |            |          |            |                |             |
|---------------------------|------------|----------|------------|----------------|-------------|
| Popolazione target        | Unità      | Pendenza | Intercetta | r <sup>2</sup> | Intervallo  |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim | cellule/μl | 1,0648   | 4,4804     | 1,0000         | 3,64 - 2862 |

## Ripetibilità

La ripetibilità del saggio è stata misurata su dieci campioni ematici in sestuplicati. I campioni sono stati analizzati utilizzando il citofluorimetro BD FACSLyric™ e il citofluorimetro Sysmex XF-1600. I coefficienti di variazione (CV) sono forniti nelle tabelle di seguito (Tabelle 9 e 10).

**Tabella 9** Ripetibilità del dispositivo su BD FACSLyric™

| BD FACSLyric™             |            |    |       |       |        |
|---------------------------|------------|----|-------|-------|--------|
| Popolazione target        | Unità      | n  | Media | DS    | CV (%) |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim | %          | 10 | 1,21  | 0,051 | 4,31   |
|                           | cellule/μl | 10 | 334   | 109   | 33     |

**Tabella 10** Ripetibilità del dispositivo su Sysmex XF-1600

| Sysmex XF-1600            |            |    |       |       |        |
|---------------------------|------------|----|-------|-------|--------|
| Popolazione target        | Unità      | n  | Media | DS    | CV (%) |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim | %          | 10 | 1,6   | 0,103 | 4,67   |
|                           | cellule/μl | 10 | 448   | 166   | 37     |

## Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata misurata su un campione di sangue stabilizzato CD-Chex CD34, Livello 3) per 15 giorni e con le stesse condizioni. I campioni sono stati analizzati utilizzando il citofluorimetro BD FACSLyric™ e il citofluorimetro Sysmex XF-1600. I coefficienti di variazione (CV) sono forniti nelle tabelle di seguito (Tabelle 11 e 12).

**Tabella 11** Riproducibilità del dispositivo su BD FACSLyric™

| Riproducibilità - BD FACSLyric™ |                           |                           |        |        |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|--------|
| Popolazione target              | Valore medio previsto (%) | Valore medio ottenuto (%) | DS     | CV (%) |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim       | 1,65                      | 1,67                      | 0,0004 | 2,42   |

**Tabella 12** Riproducibilità del dispositivo su Sysmex XF-1600

| Riproducibilità – Sysmex XF-1600 |                           |                           |        |        |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|--------|
| Popolazione target               | Valore medio previsto (%) | Valore medio ottenuto (%) | DS     | CV (%) |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim        | 1,65                      | 1,66                      | 0,0004 | 2,66   |

## 12. Prestazioni cliniche

I dati clinici sono stati raccolti in un centro clinico. Le prestazioni cliniche del dispositivo ED7080 sono state stabilite tramite confronto tra CD34 QuantiFlowEx Kit e il metodo interno accreditato di un laboratorio clinico. Sono stati esaminati 75 campioni, inclusi campioni di sangue periferico, prodotti di leucaferesi e midollo osseo. In base ai dati ottenuti, è stata riscontrata concordanza al 100% tra i vari metodi nella gestione successiva del paziente.

## 13. Valori previsti

Il dispositivo è utilizzato per l'individuazione e la quantificazione delle cellule staminali ematopoietiche vitali totali e di per sé non formula alcuna diagnosi. La valutazione della qualità del campione dipende dall'applicazione prevista.

Per tre tipi di campione, gli intervalli di valori ottenuti nello studio clinico sono presentati nel Paragrafo 11 (Prestazioni analitiche), sotto Accuratezza.

## 14. Sostanze che interferiscono e limitazioni

Il dispositivo non può essere utilizzato per l'individuazione e la quantificazione di cellule staminali mesenchimali, neurali, epiteliali e cutanee.

## 15. Riferimenti bibliografici

- 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) 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. Marchi commerciali**

BD FACSCanto™, Trucount™, FlowJo™ sono marchi registrati di Becton, Dickinson and Company, CD-Chex CD34® è un marchio registrato di Streck, Navios™, Flow-Count™ Fluorospheres è un marchio registrato di Beckman Coulter.

## **17. Cronologia delle revisioni**

Versione 4, ED7080\_IFU\_v4

Da “Funzione del dispositivo” è stato eliminato il sangue del cordone ombelicale; nei paragrafi relativi ai materiali e alle attrezzature necessarie (capitoli 5 e 6) è stata effettuata una divisione tra il metodo a piattaforma singola e quello a piattaforma doppia; sono stati corretti errori nella strategia di gating; sono state apportate modifiche ai capitoli 11, 12 e 13 (aggiunta di dati analitici e clinici); è stata inserita una citazione.

La strategia di gating delle cellule staminali CD34 è stata rivista. La Regione H (vere cellule staminali CD34+) è stata completamente specificata.

Pagina 15: correzione formula calcolo conteggio assoluto.

## **18. Produttore**

EXBIO Praha, a.s.  
Nad Safinou II 341  
25250 Vestec  
Repubblica Ceca

### **Contatti**

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

## **19. Rappresentati autorizzati**

N/A

**AVVISO:** Qualsiasi incidente grave avvenuto in relazione al dispositivo deve essere segnalato al produttore e all'autorità locale competente.