

exbio

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



Instruções de Utilização (PT)

Versão: ED7080_IFU_v5_PT

Data de emissão: 24-10-2024

Símbolos utilizados na etiquetagem do dispositivo

	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Limites de temperatura
	Marca CE de conformidade Número de identificação do órgão notificado		Manter afastado da luz solar
	Fabricante		Manter em local seco
	Identificador Único de Dispositivo		Cuidado
	Consultar instruções de utilização		Solução concentrada (10x)
	Contém o suficiente para <n> testes		Conteúdos
	Número de catálogo		Marca UKCA
	Código de lote		
	Data de validade		

1. Finalidade prevista

O CD34 QuantiFlowEx Kit destina-se à deteção e enumeração de células estaminais hematopoiéticas viáveis totais de leucócitos viáveis totais em amostras de sangue e tecidos humanos por citometria de fluxo.

O que é detetado e/ou medido

O dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit deteta e mede percentagens relativas e contagens absolutas de células-tronco hematopoiéticas humanas viáveis (CD34+CD45dim).

Função do dispositivo

O dispositivo destina-se à monitorização da contagem de células-tronco hematopoiéticas no sangue periférico, na medula óssea e no produto de leucaférese.

Contexto do estado fisiológico ou patológico

A enumeração precisa da contagem de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) em sangue humano e amostras de tecidos ou enxertos para transplante é necessária para a gestão do paciente ou processamento do enxerto ⁽¹⁾.

Tipo de ensaio

Não automatizado

Quantitativo

Tipo de espécime requerido

Sangue periférico normal, ou sangue periférico mobilizado, ou produto(s) de leucaférese, ou medula óssea.

População de teste

Não se destina a uma população específica.

2. Utilizador pretendido

O dispositivo destina-se apenas a uso profissional em laboratório. Não para teste próximo ao paciente ou autoteste.

Requisitos de qualificação

O utilizador pretendido deve ter experiência de última geração em análise de citometria de fluxo de células humanas, técnicas laboratoriais padrão, incluindo habilidades de pipetagem, manuseio seguro e adequado de amostras derivadas do corpo humano.

O utilizador pretendido deve estar em conformidade com a norma EN ISO 15189 ou outras normas nacionais, quando aplicável.

3. Princípio de análise

O princípio do teste é baseado na detecção da ligação do anticorpo monoclonal a uma molécula específica (antigénio) expressa por certas células sanguíneas humanas. Os anticorpos monoclonais usados no teste são marcados com diferentes fluorocromos que são excitados por um feixe de laser de um citómetro de fluxo durante a aquisição de uma amostra de sangue corada com anticorpos. A fluorescência subsequente (emissão de luz) de cada fluorocromo presente numa célula sanguínea adquirida é colhida e analisada pelo instrumento. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à densidade de expressão do antigénio numa célula permitindo a separação de diferentes subconjuntos de células.

O 7-AAD é um corante impermeável à membrana celular que é excluído das células viáveis e se liga ao ADN nas células não viáveis. As diferenças na intensidade da fluorescência celular permitem a exclusão de células não viáveis da análise.

4. Reagente(s) fornecido(s)

Conteúdos

O dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit é suficiente para 50 testes e é fornecido com os seguintes reagentes:

Staining Reagent (ED7080-1; 1 frasco) contendo 1 ml de combinação pré-misturada de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo CD45 FITC e CD34 PE, diluída em concentrações ideais numa solução salina tamponada com fosfato (PBS) estabilizante contendo 15 mM de azida de sódio, consulte a Tabela 1.

7-AAD (ED7080-2; 1 frasco) contendo 1 ml de corante de viabilidade celular 7-Aminoactinomicina D (7-AAD), diluído em concentrações ideais numa solução salina tamponada com fosfato (PBS) estabilizante contendo 15mM de azida de sódio.

Lysing Solution (ED7080-3; 1 frasco) contendo 15 ml de solução tamponada concentrada (10X) à base de cloreto de amoníaco, sem fixador.

Composição

Tabela 1 Descrição e concentrações de componentes ativos

Antigénio	Fluorocromo	Clone	Isótopo	Concentração (µg/ml)
CD45	FITC	MEM-28	IgG1	30
CD34	PE	4H11 [APG]	IgG1	35

5. Materiais necessários, mas não incluídos

Tanto para o Método de Plataforma Única quanto para o Método de Plataforma Dupla

Tubos de ensaio de fundo redondo (12 x 75 mm)

Água deionizada (grau de reagente)

Células de controlo de processo (Streck CD-Chex CD34[®], controlo CD34 – 3 níveis, Cat. N^o 213337, 213347, 213383 ou controlo de célula lisável equivalente com contagem pré-definida de CD34 HSC)

Apenas para o método de plataforma única

Padrão de contagem de células fluorescentes

- para uso com citómetros Becton Dickinson
 - o Tubos BD Trucount™
- para uso com citómetros Beckman Coulter
 - o Fluoroesferas Beckman Coulter Flow-Count™

6. Equipamento necessário

Tanto para o Método de Plataforma Única quanto para o Método de Plataforma Dupla

Pipeta automática com ponteiros descartáveis (20 - 100 µl) para pipetagem de amostras e reagentes

Dispensador de líquido ou pipeta com pontas descartáveis (2 ml) para dispensar solução de lise de eritrócitos

Grânulos para contagem (Tubos TruCount™ (BD Biosciences; ref. N^o 663028), Fluoroesferas FlowCount (Beckman Coulter; ref. N^o 7547053)

Misturador vortex

Citómetro de fluxo com uma fonte de excitação a laser (488 nm), detetores para luz espalhada, filtros óticos e detetores de emissão apropriados para recolher sinais de fluorocromos fornecidos na Tabela 2.

Tabela 2 Característica espectral dos fluorocromos usados no dispositivo

Fluorocromo	Excitação [nm]	Emissões [nm]
FITC	488	525
PE	488	576
7-AAD	488	670

AVISO: O dispositivo foi testado nos citómetros de fluxo BD FACSCanto™ II e BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios (Beckman Coulter) e XF-1600™

(Sysmex).

Apenas para o método de plataforma dupla

Analisador de hematologia (para contagens absolutas de células) capaz de contar glóbulos brancos (WBC) e linfócitos por μl de amostra.

7. Armazenamento e manuseamento

Armazene a 2-8°C.

Evite exposição prolongada à luz.

Não congele.

Consulte a Secção 10 Procedimento (Preparação do reagente) para obter informações sobre estabilidade em uso e prazo de validade após a primeira abertura, juntamente com as condições de armazenamento e estabilidade das soluções de trabalho (quando aplicável).

8. Avisos, precauções e limitações de utilização

Classificação de perigo GHS

Consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS - Safety Data Sheet) disponível na página do produto em www.exbio.cz para obter informações completas sobre os riscos apresentados pelas substâncias e misturas químicas contidas no Produto, e como devem ser manuseadas e descartadas.

Perigo biológico

Amostras biológicas humanas e espécimes de sangue e quaisquer materiais que entrem em contacto com eles são sempre considerados como materiais infecciosos.

Use equipamentos de proteção individual e de segurança para evitar o contacto com a pele, os olhos e as mucosas.

Siga todas as leis, regulamentos e procedimentos aplicáveis para manusear e descartar materiais infecciosos.

Evidência de deterioração

A aparência normal dos reagentes fornecidos é a de um líquido claro. Não use o reagente se observar qualquer alteração na aparência, por exemplo, turvação ou sinais de precipitação.

Limitação de utilização

Não use após a data de validade indicada nos rótulos do produto.

9. Espécime

Use sangue ou material de tecido recolhido em recetáculo de amostra classificado como dispositivo médico, com o anticoagulante EDTA, Heparina ou ACD (Ácido Citrato Dextrose).

A seguinte amostra pode ser analisada usando o dispositivo:

sangue periférico normal e mobilizado, produtos de leucaférese e medula óssea.

AVISO: Para análise de plataforma dupla, determine a contagem absoluta de leucócitos na amostra recolhida através de um analisador de hematologia. O dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit sozinho não fornece enumeração de contagens absolutas de células.

Processe a amostra no máximo 24 horas após a colheita.

Interferência Endógena

Com base na investigação da literatura científica, as fontes de interferência endógenas são identificadas na Tabela 3.

Tabela 3 Interferência Endógena do dispositivo

Interferência Endógena	Impacto	Referência
Albumina	A albumina pode interferir em concentrações elevadas devido à sua capacidade de se ligar e de libertar grandes quantidades de ligandos.	2, 3, 4
Bilirrubina (icterícia) (não conjugada)	A bilirrubina pode aumentar a fluorescência de fundo das células devido à sua elevada autofluorescência.	5, 6, 7
Resíduos celulares (após lise)	Os detritos celulares podem provocar contagens incorretas de células e esgotar o anticorpo no dispositivo.	8, 9
Eritrócitos	Uma lise insuficiente e a presença de glóbulos vermelhos na amostra podem conduzir a uma contagem incorreta de células.	6
Hemoglobina	As amostras hemolisadas podem produzir resultados erróneos.	10
Anticorpos humanos antimurinos	O tratamento com anticorpos monoclonais pode produzir resultados erróneos (capacidade de se ligar aos antígenos da superfície celular).	11, 12, 13, 14, 15, 16
Imunoglobulinas	Não pode ser lavada e pode produzir uma	8

	contagem incorreta de subconjuntos de linfócitos.	
Fatores reumatóides	A presença de RF interfere com os MIA (imunoensaios multiplex).	17
Triglicéridos	Níveis elevados de lípidos em circulação podem afetar a análise por citometria de fluxo de determinadas populações de células sanguíneas.	18

Interferência Exógena

As amostras com mais de 24 horas podem produzir resultados errôneos.

As amostras refrigeradas podem produzir resultados incorretos.

Uma preparação incorreta da solução de lise eritrocitária pode conduzir a resultados errados. Seguir as instruções do fabricante para utilizar a solução de lise de eritrócitos.

10. Procedimento

Preparação do(s) reagente(s) fornecido(s)

Staining Reagent e 7-AAD

Nenhuma preparação de reagente é necessária.

Coloque o reagente à temperatura ambiente antes de usar. Mantenha o recipiente primário do dispositivo seco.

Use o reagente diretamente a partir do seu recipiente primário original.

Após a primeira abertura, o reagente mantém as suas características de desempenho até à data de validade quando armazenado nas condições indicadas no seu recipiente primário original.

CUIDADO: Não dilua o reagente.

Lysing Solution

Dilua a solução de lise de eritrócitos concentrada (10X) na solução de lise de trabalho (1X) com água deionizada.

CUIDADO: A solução de lise de trabalho (1X) é estável por **apenas 1 dia**.

Prepare uma solução de lise de trabalho fresca (1X) a cada dia de medição misturando 1 parte da solução de lise concentrada (10X) com 9 partes de água deionizada e armazene no dispensador de líquido ou num recipiente fechado à temperatura ambiente.

Preparação de materiais necessários, mas não fornecidos

Para preparação e uso de padrões de contagem de células fluorescentes, siga as instruções do fabricante.

Controlo de qualidade

Use Streck CD-Chex CD34[®] ou células de controlo equivalentes como controlo de procedimento positivo para garantir o desempenho adequado do dispositivo conforme pretendido. O Streck CD-Chex CD34[®] fornece valores estabelecidos para contagens percentuais positivas e absolutas de CD34⁺ HSC.

Core as células de controlo usando CD34 QuantiFlowEx Kit de acordo com o processamento da amostra, conforme especificado nas instruções de uso. Verifique se os resultados obtidos (% de células positivas) estão dentro do intervalo esperado relatado para o lote de células de controlo usado.

Coloração da amostra - método de plataforma única

1. Para cada amostra, rotule um tubo de ensaio de fundo redondo de 12 × 75 mm com a identificação apropriada da amostra.

AVISO: Use o tubo BD Trucount™ como tubo de ensaio para contagem absoluta de células-tronco CD34.

2. Coloque com a pipeta 20 µl de reagente de coloração no fundo do tubo de ensaio.
3. Coloque com a pipeta 20 µl de 7-AAD no fundo do tubo de ensaio.
4. Coloque com a pipeta 100 µl de amostra bem misturada no fundo do tubo de ensaio usando a técnica de pipetagem reversa.

CUIDADO: A precisão da pipetagem é crítica para enumeração da contagem absoluta de células-tronco CD34⁺. Portanto, a técnica de pipetagem reversa usando pipeta de deslocamento automático de ar deve ser usada.

Para aspiração de amostra por pipetagem reversa, aperte o aplicador da pipeta até à 2ª paragem e aspire a amostra. Em seguida, coloque a ponta da pipeta contendo a amostra de sangue perto do fundo do tubo e aperte o aplicador da pipeta até à 1ª paragem para dispensar a amostra.

Evite aplicar com a pipeta sangue na lateral do tubo de ensaio. Se o esfregaço ou gota de sangue permanecer na lateral do tubo, poderá não ser corado com o reagente ou os eritrócitos podem não ser lisados e o resultado do teste pode não ser válido.

5. Coloque no vortex e incube o tubo de ensaio por 20-30 minutos à temperatura ambiente no escuro.
6. Adicione 2 ml de solução de lise de trabalho (1X) ao tubo de ensaio.
7. Coloque no vortex e incube o tubo de ensaio por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
8. Se o tubo BD Trucount™ não tiver sido usado como tubo de ensaio, adicione

100 µl de Fluoresferas Flow Count™ usando a técnica de pipetagem reversa. Siga as instruções do fabricante.

9. Retire a amostra corada imediatamente do citómetro de fluxo. Se a amostra corada não for obtida imediatamente, tape o tubo de ensaio, armazene a 2-8°C no escuro e analise dentro de 2 horas.

CUIDADO: Coloque no vortex a amostra corada imediatamente antes da aquisição no citómetro de fluxo para evitar agregados.

Coloração da amostra - método de plataforma dupla

CUIDADO: Determine a contagem absoluta de leucócitos na amostra recolhida através de um analisador de hematologia antes do processamento da amostra.

1. Para cada amostra, rotule um tubo de ensaio de fundo redondo de 12 × 75 mm com a identificação apropriada da amostra.
2. Coloque com a pipeta 20 µl de reagente de coloração no fundo do tubo de ensaio.
3. Coloque com a pipeta 20 µl de 7-AAD no fundo do tubo de ensaio.
4. Coloque com a pipeta 100 µl de amostra bem misturada no fundo do tubo de ensaio usando a técnica de pipetagem reversa.
5. Coloque no vortex e incube o tubo de ensaio por 20-30 minutos à temperatura ambiente no escuro.
6. Adicione 2 ml de solução de lise de trabalho (1X) ao tubo de ensaio.
7. Coloque no vortex e incube o tubo de ensaio por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
8. Retire a amostra corada imediatamente do citómetro de fluxo. Se a amostra corada não for obtida imediatamente, tape o tubo de ensaio, armazene a 2-8°C no escuro e analise dentro de 2 horas.

CUIDADO: Coloque no vortex a amostra corada imediatamente antes da aquisição no citómetro de fluxo para evitar agregados.

Análise da citometria de fluxo

O citómetro de fluxo selecionado para uso com o dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit deve ser calibrado rotineiramente usando microesferas fluorescentes para garantir sensibilidade estável dos detetores de acordo com as instruções do fabricante do citómetro.

Se não for mantido adequadamente, o citómetro de fluxo pode produzir resultados falsos.

Consulte as especificações do fabricante do citômetro para lasers e detectores de fluorescência de acordo com as características de excitação e emissão dos fluorocromos na Seção 6 (Equipamento necessário).

Defina as voltagens nos detectores de fluorescência de interesse antes da análise da amostra corada. A voltagem num detector PMT deve ser ajustada para um nível alto o suficiente, de modo que o mínimo de eventos com coloração negativa interfira no canal 0 no eixo de fluorescência. Além disso, a voltagem do detector PMT não deve exceder os valores nos quais os eventos positivos são pressionados para o eixo direito.

Dependendo da amostra, adquira pelo menos 300.000 – 1.000.000 eventos por tubo.

Adquira sempre os parâmetros de dispersão de luz da célula: Dispersão de luz de ângulo frontal (área de sinal e altura de sinal) e dispersão de luz lateral (perpendicular) (área de sinal e altura de sinal).

Para o método de **plataforma única** defina o limite de fluorescência no detector FITC em vez do tamanho do evento para recolha de dados. O limite na dispersão direta (tamanho do evento) pode excluir eventos de micropartículas do padrão de contagem da análise, o que influenciaria negativamente a enumeração da percentagem de células-tronco CD34+.

Para o método de **plataforma dupla** defina o limite na dispersão direta.

Compense os sinais de fluorescência entre detectores antes ou depois da aquisição de dados. Os dados podem ser interpretados incorretamente se os sinais de fluorescência forem compensados indevidamente ou se os portões forem posicionados de forma imprecisa.

AVISO: Amostras com baixa viabilidade celular esperada devem ser usadas para a preparação do controlo de compensação 7-AAD, por exemplo, células sanguíneas processadas com solução de lise à base de formaldeído. Amostras com alta viabilidade celular fornecem baixo número de células mortas. Uma baixa contagem de células mortas pode influenciar negativamente a intensidade média da fluorescência do 7-AAD de células mortas e pode produzir uma compensação inadequada.

Para análise dos dados medidos, é possível usar o software do citômetro desenvolvido pelo fabricante, ou software dedicado para análise de dados de citometria offline (por exemplo, FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Análise de dados da amostra corada CD34 QuantiFlowEx Kit

Analise os dados medidos e compensados usando o software apropriado. Deve ser aplicado o protocolo de *gating* da International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (Fig. 1-5) para enumeração da percentagem de células-tronco CD34+ vivas.

Usando 5 parâmetros (2 parâmetros de dispersão de luz e 3 parâmetros fluorescentes) as células-tronco hematopoiéticas CD34+ são identificadas por uma combinação de *gating* sequencial e booleano de acordo com as suas propriedades.

As verdadeiras células-tronco CD34+ expressam antígenos CD34 e CD45, porém a expressão de CD45 é semelhante à das células blásticas. A intensidade da coloração é detetável, mas menor do que, por exemplo, em linfócitos.

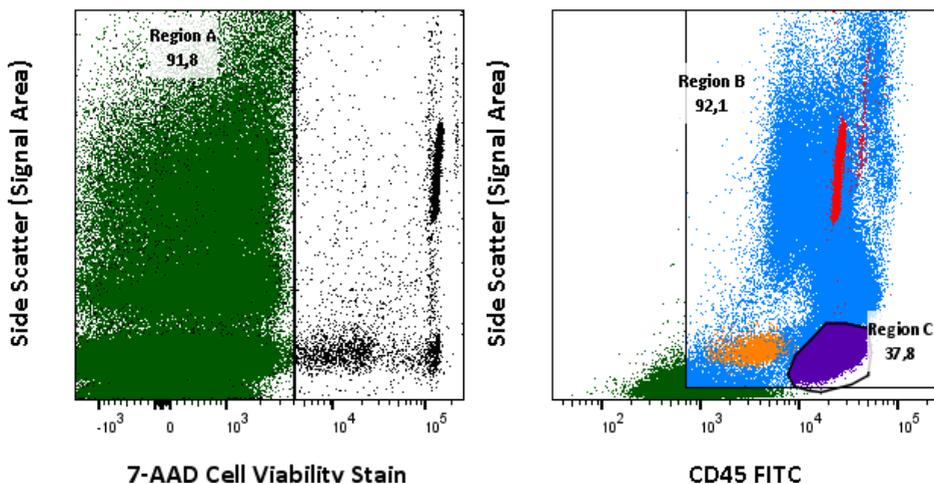
As verdadeiras células-tronco CD34+ também fornecem sinal de dispersão de luz de ângulo frontal semelhante ao das células blásticas ou linfócitos e exibem propriedades de reduzida dispersão de luz perpendicular (dispersão lateral).

As Figuras 1-5 mostram a sequência de gating lógico que assegura a identificação precisa das células estaminais CD34⁺ vivas para uma contagem percentual exata.

Em primeiro lugar, visualize todos os eventos num gráfico de pontos da Área de Sinal de Dispersão Lateral (SSC-A) vs. coloração de viabilidade 7 AAD e coloque um gate em torno das células vivas (7-AAD negativo), conforme indicado pela Região A na imagem à esquerda.

AVISO: quando se utiliza um controlo de sangue estabilizado como, por exemplo, Streck CD-Chex CD34[®], recomenda-se vivamente a verificação da Região A de viabilidade e o reposicionamento da região, se necessário, uma vez que o sangue estabilizado contém formaldeído que permeia a membrana celular, resultando numa coloração positiva do corante de viabilidade 7-AAD.

Figura 1 A imagem da esquerda representa a seleção da população viável. A imagem da direita representa todos os eventos fechados das regiões A, B, C, G (derivada da região F) e I.

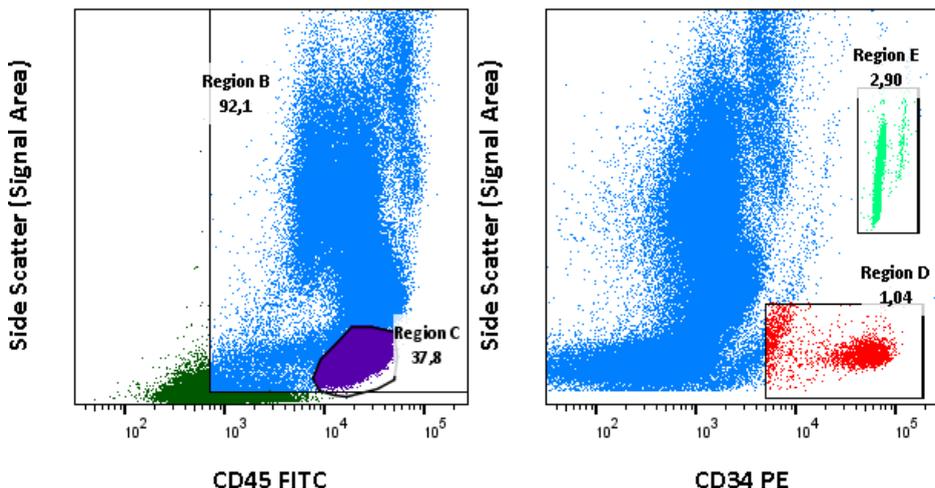


Visualize as células da Região A num gráfico de pontos de SSC-A vs. CD45 FITC e coloque um gate em torno dos **leucócitos (Região B)** e um gate em torno dos **linfócitos representados como Região C**.

Coloque as células da Região B num gráfico de pontos SSC-A vs. CD34 PE e coloque um gate em torno dos **eventos CD34 positivos (Região D)**.

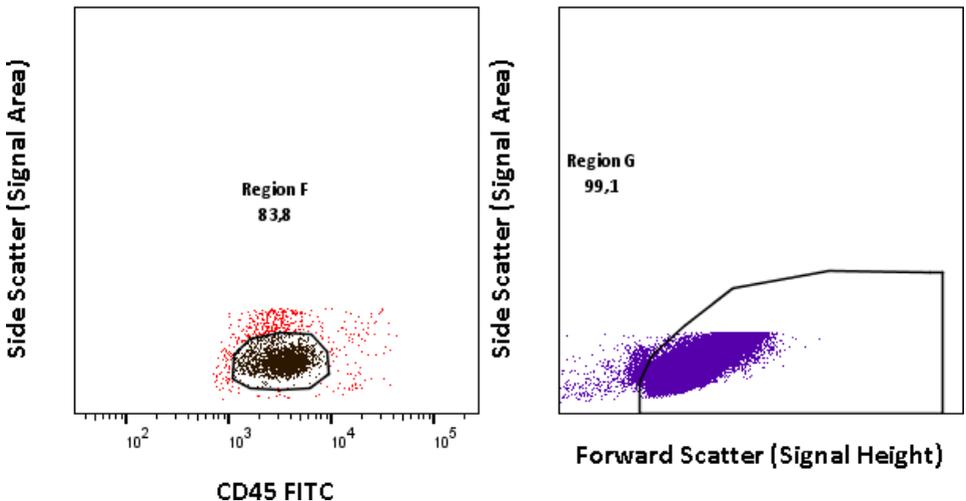
A imagem à direita mostra **todos os eventos**, incluindo as micropartículas fluorescentes da **Região I** representadas na **Região E**. A **Região E** indica as propriedades óticas e fluorescentes do padrão de contagem de micropartículas fluorescentes presente no Tubo BD TruCount™ (apenas para o método de plataforma única).

Figura 2 A imagem da esquerda representa a seleção da população viável de leucócitos (Região B) e linfócitos (Região C). A imagem da direita visualiza eventos CD34 positivos viáveis (Região D) selecionados a partir de leucócitos (Região B). Para o método de plataforma única, pode ser colocado um gate (região E) à volta dos grânulos fluorescentes.



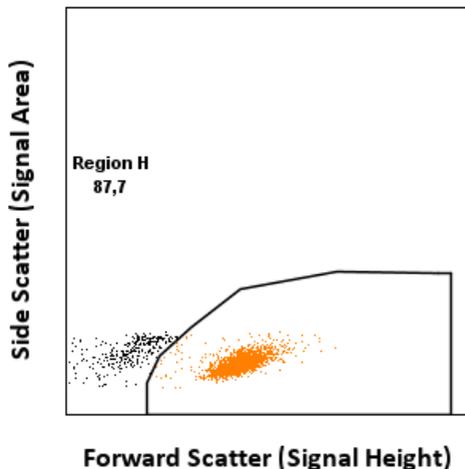
Purifique os eventos positivos CD34 da Região D colocando uma **Região F** em torno do cluster de células positivas CD45 dim no diagrama de dispersão SSC-A vs CD45 FITC com eventos da Região D, conforme ilustrado na Figura 3 à esquerda. Exibir linfócitos CD45⁺ (Região C) no gráfico de pontos SSC-A vs Altura do Sinal de Dispersão Frontal (FSC-H). Colocar um novo gate que delimite os linfócitos CD45⁺ dos eventos mais pequenos e dos detritos (**Região G**), conforme ilustrado na Figura 3 à direita.

Figura 3 A imagem da esquerda visualiza a remoção de casos não específicos corados com CD34, ou seja, plaquetas ou agregados. A região F foi utilizada para delinear células especificamente coradas que são CD45^{dim}SSCs^{low} CD34⁺. A imagem à direita visualiza a delimitação dos linfócitos CD45⁺ (Região G) da Região C.



Copie o gate da **Região G** que delinea os linfócitos da **Fig. 3** (imagem da direita) e cole no gráfico de pontos SSC-A vs. FSC-H que contém eventos da **Região F** e crie a **Região H**, para diferenciar o grupo de células estaminais CD34⁺ de eventos mais pequenos e detritos. As células da Região F (Figura 3) encontradas no interior do gate da **Região H** representam células estaminais CD34⁺ verdadeiras.

Figura 4 A imagem representa a seleção de células estaminais CD34⁺ verdadeiras (Região H).



Apenas para o método de plataforma única:

Para garantir que é colocado o gate correto para os grânulos fluorescentes (região E), devem ser visualizados os gates de controlo (regiões I, J e K nas figuras 5 e 6).

Visualizar **todos os eventos** em CD34 PE vs. CD45 FITC e colocar regiões à volta do padrão de contagem de micropartículas fluorescentes que delinea as micropartículas do BD TruCount™ (**Região I**) ou as micropartículas do Flow-Count™ da Beckman Coulter (**Região J**).

AVISO: o tamanho dos grânulos de contagem e as propriedades de fluorescência podem diferir consoante o fabricante.

Figura 5 A imagem da esquerda representa o tamanho e as propriedades fluorescentes dos grânulos BD TruCount™ Tube (Região I). A imagem da direita representa o tamanho e as propriedades fluorescentes dos grânulos BC Flow-Count™ Fluorospheres (Região J).

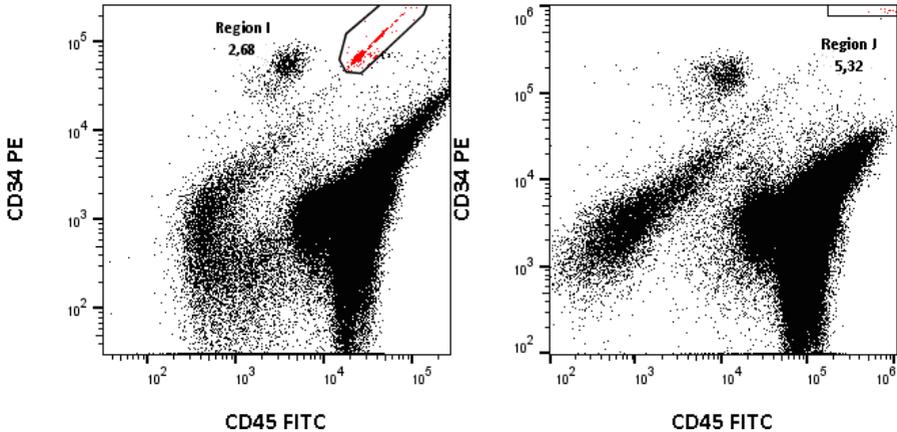
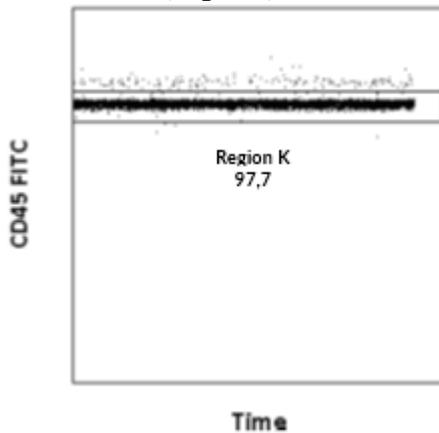


Figura 6 A imagem visualiza todos os grânulos de contagem de singletes no tempo (Região K).



AVISO: qualquer não homogeneidade na Região K (perturbação na aquisição, diminuição da fluorescência) deve ser considerada para revisão. A aquisição não homogênea de eventos ou uma aquisição que não seja perpendicular ao eixo do FITC CD45 indica problemas com os fluidos de um citômetro de fluxo.

Cálculo e interpretação de resultados analíticos - método de plataforma única

Use as equações abaixo para a enumeração da contagem percentual e absoluta de células-tronco CD34⁺ vivas de todos os leucócitos vivos.

Enumeração da contagem absoluta de células-tronco vivas CD34⁺ por 1 µl de material sanguíneo:

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

Enumeração da contagem absoluta de leucócitos vivos por 1 µl de material sanguíneo:

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

Enumeração da percentagem de células-tronco vivas CD34⁺ de todos os leucócitos vivos:

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

CD34⁺ Abs Contagem absoluta de células-tronco vivas CD34⁺ por 1 µl de material sanguíneo

Leucócitos Abs Contagem absoluta de leucócitos vivos por 1 µl de material sanguíneo

% CD34⁺ Percentagem de células-tronco vivas CD34⁺ de todos os leucócitos vivos

Região B Número de eventos na Região B (leucócitos)

Região H Células-tronco CD34⁺ verdadeiras

Região E Número de eventos na Região E (micropartículas)

P número de micropartículas por teste (presentes no tubo de ensaio) indicado pelo fabricante da micropartícula

V volume da amostra- 100 µl

DF Fator de diluição (diluição da amostra antes da coloração); DF = 2 significa que 1 parte de material sanguíneo (100 µl) foi diluída usando 1 parte de PBS contendo 0,5% de BSA (100 µl)

Cálculo e interpretação de resultados analíticos - método de plataforma dupla

Use o analisador de hematologia para definir a contagem de leucócitos por µl de amostra. Consulte as instruções do fabricante do analisador de hematologia.

Use as equações abaixo para a enumeração da contagem percentual e absoluta de células-tronco CD34⁺ vivas de todos os leucócitos vivos.

Enumeração da contagem absoluta de células-tronco vivas CD34⁺ por 1 µl de material sanguíneo:

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

Enumeração da percentagem de células-tronco vivas CD34⁺ de todos os leucócitos vivos:

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

CD34⁺ Abs Contagem absoluta de células-tronco vivas CD34⁺ por 1 µl de material sanguíneo

Leucócitos Abs Contagem absoluta de leucócitos vivos por 1 µl de material sanguíneo definida usando o analisador de hematologia

% CD34⁺ Percentagem de células-tronco vivas CD34⁺ de todos os leucócitos vivos

Região B Número de eventos na Região B (leucócitos)

Região H Número de células-tronco CD34⁺ verdadeiras

DF Fator de diluição (diluição da amostra antes da coloração); DF = 2 significa que 1 parte de material sanguíneo (100 µl) foi diluída usando 1 parte de PBS contendo 0,5% de BSA (100 µl)

11. Desempenho analítico

Especificidade

O anticorpo MEM-28 reconhece todas as isoformas de leucócitos do CD45 humano (proteína tirosina fosfatase recetora tipo C). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (workshop HLDA III ⁽¹⁹⁾).

O anticorpo 4H11[APG] reconhece o epítipo de classe III do antigénio CD34 humano (Mucosialina). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (workshop HLDA VI ⁽²⁰⁾).

Precisão

A exatidão do método foi determinada através da comparação do CD34 QuantiFlowEx Kit do dispositivo com o método de plataforma dupla interno de um laboratório clínico acreditado e bem documentado (cocktail de anticorpos conjugados de cor única de diferentes fabricantes, combinado com uma solução de lise à base de cloreto de amónio) através da coloração paralela de 75 amostras de sangue ou de tecido analisadas pelo citómetro de fluxo BD FACSCanto™ II ou pelo citómetro de fluxo Beckman Coulter Navios (tabela 4, 5, 6). Os parâmetros da análise de regressão linear são apresentados nos quadros 4 a 6.

Tabela 4 Análise de regressão linear para células estaminais CD34+ no sangue periférico (comparação do dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit com o método interno de um laboratório clínico acreditado) analisadas pelo citómetro de fluxo BD FACSCanto™ II ou pelo citómetro de fluxo Beckman Coulter Navios.

Comparação do ED7080 com o método acreditado						
Sangue periférico						
População-alvo	Unidade	n	Declive	Interceção	r ²	Faixa
CD34 ⁺ CD45dim	%	30	0,9743	-0,0005	0,9967	0,02 - 2,22
	células/μl	30	0,9757	-0,4106	0,9947	0,24 - 468

Tabela 5 Análise de regressão linear para células estaminais CD34+ em produtos de leucaférese (comparação do método interno do laboratório clínico acreditado com dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit) analisados pelo citómetro de fluxo BD FACSCanto™ II ou pelo citómetro de fluxo Beckman Coulter Navios.

Comparação do ED7080 com o método acreditado						
Produtos de leucaférese (PBSC)						
População-alvo	Unidade	n	Declive	Interceção	r ²	Faixa
CD34 ⁺ CD45dim	%	25	0,9999	-0,0061	0,9925	0,81 - 10,56
	células/μl	25	0,9844	45,762	0,9918	1392 - 17497

Tabela 6 Análise de regressão linear para células estaminais CD34+ em medula óssea (comparação do método interno do laboratório clínico acreditado com o dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit) analisadas pelo citómetro de fluxo BD FACSCanto™ II ou pelo citómetro de fluxo Beckman Coulter Navios.

Comparação do ED7080 com o método acreditado						
Medula óssea						
População-alvo	Unidade	n	Declive	Interceção	r ²	Faixa
CD34 ⁺ CD45dim	%	20	0,9385	0,0467	0,9954	0,24 - 3,14
	células/μl	20	1,028	-4,1351	0,9991	47 - 1708

Linearidade

A linearidade do método foi verificada com o derivado de sangue "Buffy Coat" de um dador de sangue saudável enriquecido com 11 diluições consecutivas (em série; 2 vezes) de células CD34+ (KG-1) em 1 dia por 1 operador, analisadas pelo citómetro de fluxo BD FACSCanto™. A regressão linear foi usada para avaliação do valor esperado contra o valor médio recuperado em cada diluição. A faixa de

linearidade é apresentada na tabela 7.

Tabela 7 Linearidade do dispositivo em BD FACSCanto™ II

BD FACSCanto™ II					
População-alvo	Unidade	Declive	Interceção	r ²	Intervalo
CD34 ⁺ CD45dim	células/μl	1,0648	4,4804	1,0000	3,64 – 2862

Repetibilidade

A repetibilidade do ensaio foi medida em dez amostras de sangue em múltiplos de seis. As amostras foram analisadas usando o citómetro de fluxo BD FACSLyric™ e o citómetro de fluxo Sysmex XF-1600™. Os coeficientes de variação (CV) são fornecidos nas tabelas abaixo (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 Repetibilidade do dispositivo em BD FACSLyric™

BD FACS Lyric™					
População-alvo	Unidade	n	Intervalo de valores avaliado	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0035	7,2
	células/μl	10	8-20	1,0	7,2

Tabela 9 Repetibilidade do dispositivo em Sysmex XF-1600™

Sysmex XF-1600™					
População-alvo	Unidade	n	Intervalo de valores avaliado	SD	CV (%)
CD34 ⁺ CD45dim	%	10	0,03-0,07	0,0047	9,4
	células/μl	10	7-20	1,2	9,4

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi medida em amostra de sangue estabilizada (CD- Chex CD34, Nível 3) nas mesmas condições por 15 dias. As amostras foram analisadas usando o citómetro de fluxo BD FACSLyric™ e o citómetro de fluxo Sysmex XF-1600™. Os coeficientes de variação (CV) são dados nas tabelas abaixo (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 Reprodutibilidade do dispositivo em BD FACSLyric™

Reprodutibilidade - BD FACSLyric™						
Tipo de amostra	Intervalo previsto (%)	Valor médio esperado (%)	Valor médio obtido (%)	SD	CV (%)	Faixa de valores medidos
CD-Chex CD34, Level 3	1,35 - 1,95	1,65	1,67	0,06	3,6	1,46-1,70

Tabela 11 Reprodutibilidade do dispositivo em Sysmex XF-1600™

Reprodutibilidade - Sysmex XF-1600™						
Tipo de amostra	Intervalo previsto (%)	Valor médio esperado (%)	Valor médio obtido (%)	SD	CV (%)	Faixa 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 análise de citometria de fluxo foram utilizados os seguintes citômetros de fluxo, incluindo a versão do software:

BD FACSCanto™ II BD FACSDiva Software - versão 8.0.2

BD FACSLyric™ BD FACSSuite Software - versão 1.5

Sysmex XF-1600™ IPU Software - versão 0(0.09-00)

Navios EX Navios Ex Software v2.0

Para contagens absolutas de células foi utilizado o analisador hematológico de método de plataforma dupla com as seguintes especificações:

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

Para avaliação dos dados medidos foi utilizada a seguinte plataforma de análise: FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - versão 10.9.0

12. Desempenho clínico

Os dados clínicos foram recolhidos numa instalação clínica. O desempenho clínico do dispositivo ED7080 foi determinado por comparação do CD34 QuantiFlowEx Kit com o método interno de um laboratório clínico acreditado. Foram testadas 75 amostras, incluindo sangue periférico, produtos de leucaférese e amostras de medula óssea. A diferença entre os métodos foi inferior a 10% em 67 das 75 determinações, o que significa que os resultados obtidos por ambos os métodos

foram praticamente os mesmos. As diferenças relativas entre os métodos variaram entre -13% e +11%. Estes dados foram posteriormente comparados utilizando a análise de regressão linear e a avaliação de Bland-Altman da concordância entre métodos (diferença relativa nas contagens), que revelou uma concordância muito boa entre os métodos. O valor médio das diferenças relativas na contagem entre os dois métodos é de 1% e um erro padrão de 6%.

As diretrizes para a determinação de CD34+ HSC sugerem a comparação dos resultados com uma diferença relativa máxima aceitável entre duplicados até 10%²¹. De acordo com estas recomendações, estes métodos fornecem dados que podem ser considerados equivalentes entre si.

13. Valores esperados

O dispositivo destina-se à detecção e contagem do total de células estaminais hematopoiéticas viáveis e não estabelece, por si só, qualquer diagnóstico em que se possa estabelecer uma faixa normal de valores.

Para três tipos de amostras, as faixas de valores obtidas em estudos clínicos são apresentadas na Seção 11 (Desempenho analítico), parte de Precisão.

14. Limites

O dispositivo não se destina à identificação e enumeração de células-tronco mesenquimais, neurais, epiteliais e da pele.

neural, epithelial and skin stem cells.

As amostras com uma contagem muito elevada de leucócitos devem ser diluídas antes da coloração em PBS para obter uma contagem de leucócitos inferior a 20×10^3 células/ μl ²².

15. Referências

- 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. Resumo da segurança e do desempenho

O resumo da segurança e do desempenho estará disponível na base de dados Eudamed em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Até lá, o resumo da segurança e do desempenho está disponível mediante pedido.

17. Utilização de Marcas Registradas de Terceiros

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, Trucount™, FlowJo™ são marcas registadas da Becton, Dickinson and Company, Sysmex XF-1600™ é uma marca registada da Sysmex Corporation, CD-Chex CD34® é uma marca registada da Streck, Navios™, Fluoresferas Flow-Count™ são marcas registadas da Beckman Coulter.

18. Histórico de revisão

Versão 5, ED7080_IFU_v5

Nova apresentação do IFU de acordo com os requisitos da IVDR (UE) 2017/746. Aditamento do número de Identificação do Organismo Notificado. Aditamento do novo capítulo 16, "Resumo da segurança e do desempenho". Alteração do texto da estratégia de gating, foram feitas recomendações para gating de plataforma única. Clarificação do termo "fator de diluição". Alterações nos capítulos 11, 12, 14 e 15 (adição de dados analíticos e clínicos).

19. Fabricante

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

Informação de contacto

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

20. Representantes autorizados

N/A

AVISO: Qualquer incidente grave ocorrido em relação ao dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade local competente.