

# exbio

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



### Istruzioni per l'uso (IT)

Versione: ED7080\_IFU\_v5\_IT

Data di pubblicazione: 24-10-2024

#### Simboli utilizzati nell'etichettatura del dispositivo

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  | Dispositivo medico-diagnostico in vitro  |  | Limite di temperatura                                    |
|  | Marcatura CE di dichiarazione di conformità<br>Numero identificativo dell'organismo notificato |  | 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™ II e BD FACSLytic™ (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.

### Interferenza endogena

Sulla base delle ricerche effettuate nella letteratura scientifica, nella Tabella 3 sono riportate le fonti di interferenza endogena.

**Tabella 3** Interferenza endogena del dispositivo

| Interferenza endogena               | Impatto  | Riferimento            |
|-------------------------------------|--|------------------------|
| Albumina                            | L'albumina può interferire in concentrazioni elevate a causa della sua capacità di legare e rilasciare grandi quantità di ligandi. | 2, 3, 4                |
| Bilirubina (ittero) (non coniugata) | La bilirubina può aumentare il fondo di fluorescenza delle cellule a causa della sua elevata autofluorescenza.                     | 5, 6, 7                |
| Detriti cellulari (dopo la lisi)    | I detriti cellulari possono fornire un conteggio impreciso delle cellule e impoverire l'anticorpo all'interno del dispositivo.     | 8, 9                   |
| Eritrociti                          | Con una lisi insufficiente, i globuli rossi presenti nel campione possono dare luogo a un conteggio errato delle cellule.          | 6                      |
| Emoglobina                          | I campioni emolizzati possono dare risultati errati.   | 10                     |
| Anticorpi umani anti-murini         | Il trattamento con anticorpi monoclonali può dare risultati errati (capacità di legarsi agli antigeni della superficie cellulare). | 11, 12, 13, 14, 15, 16 |
| Immunoglobuline                     | Non possono essere rimosse e possono produrre una conta errata dei sottogruppi linfocitari.  | 8                      |

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| Fattori reumatoidi | La presenza del fattore reumatoide (RF) interferisce con i test di immunodosaggio multiplex (MIA)                                    | 17 |
| Trigliceridi       | Elevati livelli circolanti di lipidi possono influenzare l'analisi in citometria a flusso di alcune popolazioni di cellule ematiche. | 18 |

### **Interferenza esogena**

I campioni più vecchi di 24 ore possono dare risultati errati.

I campioni refrigerati possono dare risultati errati.

Una preparazione errata della soluzione di lisi degli eritrociti può portare a risultati errati. Seguire le istruzioni del produttore per l'uso della soluzione di lisi degli eritrociti.

## **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.
3. Pipettare 20 µl di 7-AAD sul fondo della provetta.
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.
3. Pipettare 20 µl di 7-AAD sul fondo della provetta.
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.

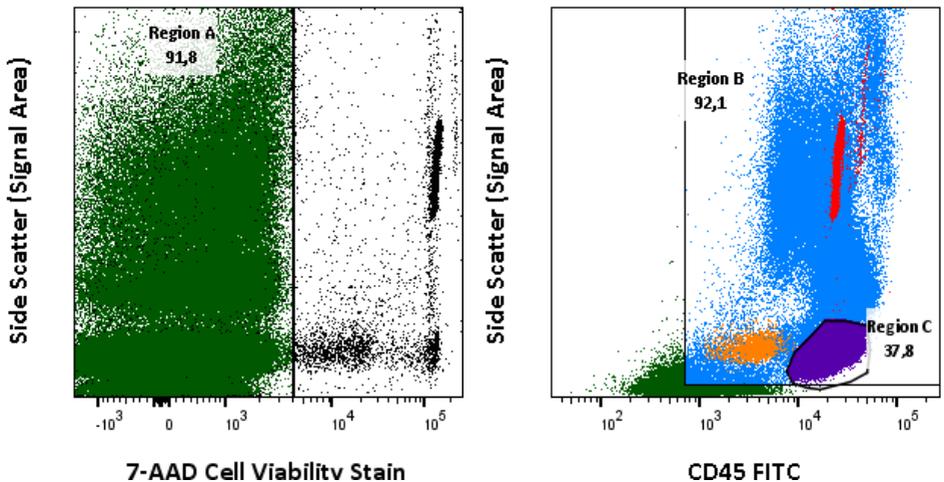
Le reali cellule staminali CD34+ forniscono anche un segnale di forward angle light scatter simile ai blasti o ai linfociti e mostrano proprietà esigue di light scatter ortogonale (side scatter).

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.

In primo luogo, visualizzare tutti gli eventi in un diagramma a punti Side Scatter Signal Area (SSC-A) rispetto alla colorazione di vitalità 7-AAD e posizionare un gate intorno alle cellule vive (7-AAD negative), come mostrato dalla regione A nell'immagine a sinistra.

**AVVISO:** quando si utilizza un controllo con sangue stabilizzato, come ad esempio Streck CD-Chex CD34<sup>®</sup>, si consiglia vivamente di controllare la vitalità della regione A e di riposizionare la regione se necessario, poiché il sangue stabilizzato contiene formaldeide che permea la membrana cellulare e determina una colorazione positiva del colorante di vitalità 7-AAD.

**Figura 1** L'immagine a sinistra rappresenta la selezione della popolazione vitale. L'immagine a destra rappresenta tutti gli eventi gated delle Regioni A, B, C, G (derivata dalla Regione F) e l.

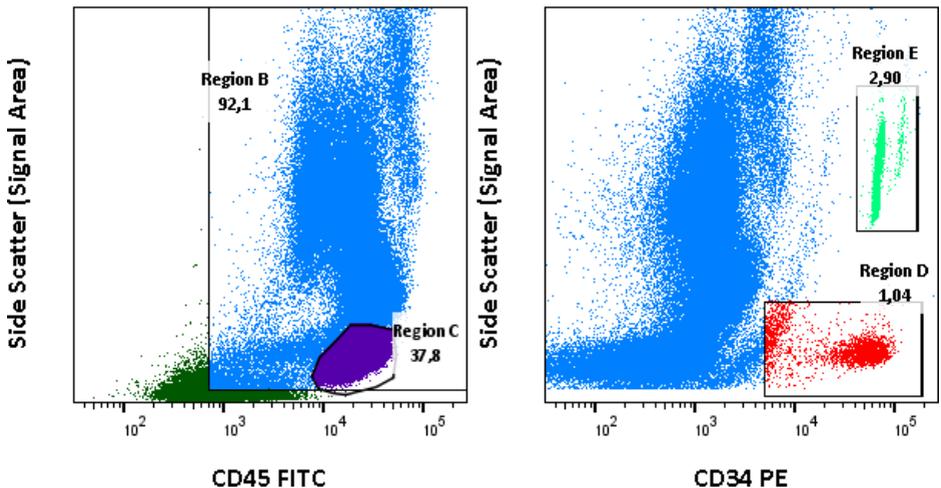


Visualizzare le cellule della regione A in un diagramma a punti SSC-A vs. CD45 FITC e posizionare un gate attorno ai **leucociti (Regione B)** e un gate attorno ai **linfociti rappresentati come Regione C**.

Portare le cellule della regione B in un diagramma a punti SSC-A vs. CD34 PE e posizionare un gate attorno agli **eventi CD34 positivi (Regione D)**.

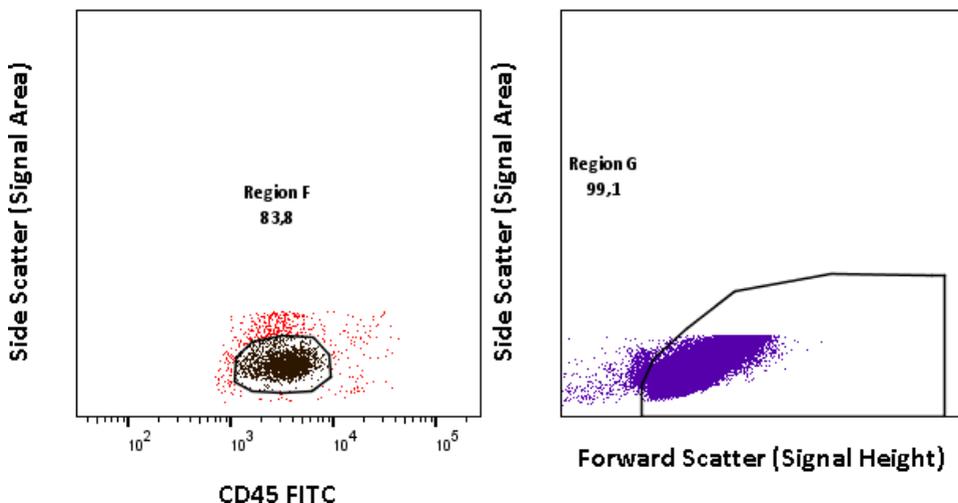
L'immagine a destra mostra **tutti gli eventi**, comprese le microparticelle fluorescenti della **Regione I** rappresentate nella **Regione E**. La **regione E** indica le proprietà ottiche e di fluorescenza dello standard di conteggio delle microparticelle fluorescenti presente nella Provetta BD TruCount™ (solo per il metodo a piattaforma singola).

**Figura 2** L'immagine a sinistra rappresenta la selezione della popolazione vitale di leucociti (Regione B) e linfociti (Regione C). L'immagine a destra visualizza gli eventi vitali CD34 positivi (Regione D) selezionati dai leucociti (Regione B). Per il metodo a piattaforma singola, è possibile posizionare un gate (Regione E) intorno ai punti fluorescenti.



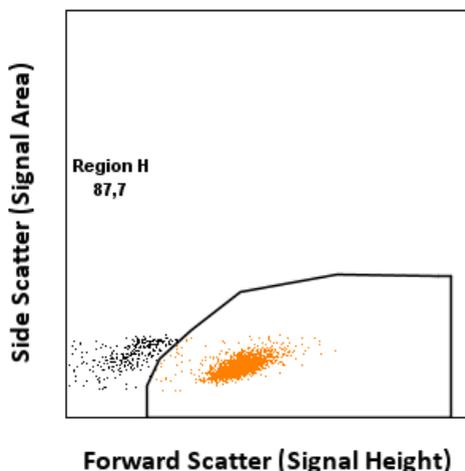
Purificare gli eventi CD34 positivi dalla Regione D posizionando una **Regione F** intorno al cluster di cellule CD45 dim-positivo nel diagramma a punti SSC-A vs. CD45 FITC con gli eventi della Regione D come mostrato nella Figura 3 a sinistra. Visualizzare i linfociti CD45<sup>+</sup> (Regione C) nel diagramma a punti SSC-A vs. Forward Scatter Signal Height (FSC-H). Posizionare un nuovo gate che delimiti i linfociti CD45<sup>+</sup> dagli eventi più piccoli e dai detriti (**Regione G**) come mostrato nella Figura 3 a destra.

**Figura 3** L'immagine a sinistra visualizza la rimozione di casi non specifici di colorazione CD34, ad esempio piastrine o aggregati. La Regione F è stata utilizzata per delineare le cellule specificamente colorate che sono CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>low</sup> CD34<sup>+</sup>. L'immagine a destra visualizza la delimitazione dei linfociti CD45<sup>+</sup> (Regione G) dalla Regione C.



Copiare il **gate** della Regione G che delinea i linfociti dalla **Fig. 3** (immagine a destra) e incollarlo nel diagramma a punti SSC-A vs. FSC-H contenente gli eventi della **Regione F** e creare la **Regione H** per differenziare il cluster di cellule staminali CD34<sup>+</sup> da eventi più piccoli e detriti. Le cellule della Regione F (Figura 3) trovate all'interno del gate della **regione H** rappresentano vere cellule staminali CD34<sup>+</sup>.

**Figura 4** L'immagine rappresenta la selezione di cellule staminali CD34<sup>+</sup> vere (Regione H).



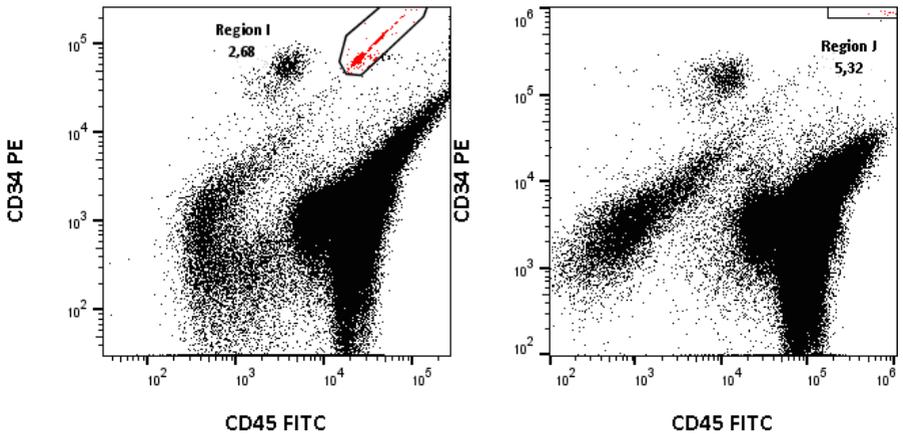
Solo per il metodo a piattaforma singola:

Per assicurarsi che venga posizionato il gate corretto per i punti fluorescenti (Regione E), è necessario visualizzare i gate di controllo (regioni I, J, K nelle Figure 5 e 6).

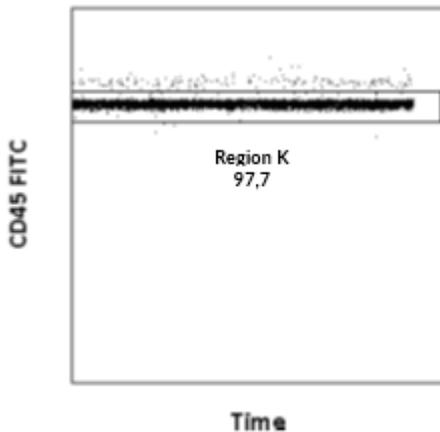
Visualizzare **tutti gli eventi** in CD34 PE vs. CD45 FITC e posizionare le regioni intorno allo standard di conteggio delle microparticelle fluorescenti delineando le microparticelle da BD TruCount™ (**Regione I**) o le microparticelle da Beckman Coulter Flow-Count™ (**Regione J**).

**AVVISO:** le dimensioni delle microparticelle di conteggio e le proprietà di fluorescenza possono differire tra i vari produttori.

**Figura 5** L'immagine a sinistra rappresenta le dimensioni e le proprietà di fluorescenza delle microparticelle nel BD TruCount™ Tube (Regione I). L'immagine a destra rappresenta le dimensioni e le proprietà di fluorescenza delle microparticelle BC Flow-Count™ Fluorospheres (Regione J).



**Figura 6** L'immagine visualizza tutte le microparticelle di conteggio nel tempo (Regione K).



**AVVISO:** qualsiasi disomogeneità nella Regione K (disturbi nell'acquisizione, diminuzione della fluorescenza) deve essere presa in considerazione per una revisione. Un'acquisizione non omogenea degli eventi o un'acquisizione non perpendicolare all'asse CD45 FITC indica problemi di fluidità del citometro a flusso.

## 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>(19)</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>(20)</sup>).

### **Accuratezza**

L'accuratezza del metodo è stata determinata confrontando il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit con il metodo a doppia piattaforma interno di un laboratorio clinico accreditato e ben documentato (cocktail di anticorpi monocolori coniugati di diversi produttori combinati con una soluzione lisante a base di cloruro di ammonio) mediante la colorazione parallela di 75 campioni di sangue o tessuto analizzati sia con il citometro a flusso BD FACSCanto™ II sia con il citometro a flusso Beckman Coulter Navios (tabelle 4, 5, 6). I parametri dell'analisi di regressione lineare sono riportati nelle Tabelle 4-6.

**Tabella 4** Analisi di regressione lineare per le cellule staminali CD34+ nel sangue periferico (confronto tra il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit e il metodo interno di un laboratorio clinico accreditato) analizzato con il citometro a flusso BD FACSCanto™ II o il citometro a flusso Beckman Coulter Navios.

| Confronto ED7080 con metodo accreditato |            |    |          |            |                |             |
|---|------------|----|----------|------------|----------------|-------------|
| Sangue periferico                       |            |    |          |            |                |             |
| Popolazione target                      | Unità      | n  | Pendenza | Intercetto | 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 5** Analisi di regressione lineare per le cellule staminali CD34+ nei prodotti di leucaferesi (confronto tra il metodo interno al laboratorio clinico accreditato del dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit) analizzato con il citometro a flusso BD FACSCanto™ II o il citometro a flusso Beckman Coulter Navios.

| Confronto ED7080 con metodo accreditato |            |    |          |            |                |              |
|---|------------|----|----------|------------|----------------|--------------|
| Prodotti di leucaferesi (PBSC)          |            |    |          |            |                |              |
| Popolazione target                      | Unità      | n  | Pendenza | Intercetto | 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   | 45,762     | 0,9918         | 1392 - 17497 |

**Tabella 6** Analisi di regressione lineare per le cellule staminali CD34+ nel midollo osseo (confronto tra il dispositivo CD34 QuantiFlowEx Kit e il metodo interno di un laboratorio clinico accreditato) analizzato dal citometro a flusso BD FACSCanto™ II o dal citometro a flusso Beckman Coulter Navios.

| Confronto ED7080 con metodo accreditato |            |    |          |            |                |             |
|---|------------|----|----------|------------|----------------|-------------|
| Midollo osseo                           |            |    |          |            |                |             |
| Popolazione target                      | Unità      | n  | Pendenza | Intercetto | r <sup>2</sup> | Intervallo  |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim               | %          | 20 | 0,9385   | 0,0467     | 0,9954         | 0,24 - 3,14 |
|   | cellule/μl | 20 | 1,028    | -4,1351    | 0,9991         | 47 - 1708   |

## Linearità

La linearità del metodo è stata verificata su un derivato di sangue "Buffy Coat" di un donatore di sangue sano, addizionato di 11 diluizioni consecutive (seriali; 2 volte) di cellule CD34+ (KG-1) in 1 giorno da parte di 1 operatore, analizzate con il citometro a flusso BD FACSCanto™ II. 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 7.

**Tabella 7** Linearità del dispositivo su BD FACSCanto™ II

| BD FACSCanto™ II          |            |          |            |                |             |
|---------------------------|------------|----------|------------|----------------|-------------|
| 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 8 e 9).

**Tabella 8** Ripetibilità del dispositivo su BD FACSLyric™

| BD FACSLyric™             |            |    |                               |        |        |
|---------------------------|------------|----|-------------------------------|--------|--------|
| Popolazione target        | Unità      | n  | Intervallo di valore valutato | DS     | CV (%) |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim | %          | 10 | 0,03-0,07                     | 0,0035 | 7,2    |
|                           | cellule/μl | 10 | 8-20                          | 1,0    | 7,2    |

**Tabella 9** Ripetibilità del dispositivo su Sysmex XF-1600™

| Sysmex XF-1600™           |            |    |                               |        |        |
|---------------------------|------------|----|-------------------------------|--------|--------|
| Popolazione target        | Unità      | n  | Intervallo di valore valutato | DS     | CV (%) |
| CD34 <sup>+</sup> CD45dim | %          | 10 | 0,03-0,07                     | 0,0035 | 7,2    |
|                           | cellule/μl | 10 | 8-20                          | 1,0    | 7,2    |

### 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 10 e 11).

**Tabella 10** Riproducibilità del dispositivo su BD FACSLyric™

| Riproducibilità - BD FACSLyric™ |                         |                         |                           |      |        |                               |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|------|--------|-------------------------------|
| Tipo di campione                | Intervallo previsto (%) | Valore medio atteso (%) | Valore medio ottenuto (%) | DS   | CV (%) | Intervallo di valori misurato |
| CD-Chex CD34, Level 3           | 1,35 - 1,95             | 1,65                    | 1,67                      | 0,06 | 3,6    | 1,46-1,70                     |

**Tabella 11** Riproducibilità del dispositivo su Sysmex XF-1600™

| Riproducibilità - Sysmex XF-1600™ |                         |                         |                           |      |        |                               |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|------|--------|-------------------------------|
| Tipo di campione                  | Intervallo previsto (%) | Valore medio atteso (%) | Valore medio ottenuto (%) | DS   | CV (%) | Intervallo di valori misurato |
| CD-Chex CD34, Level 3             | 1,35 - 1,95             | 1,65                    | 1,54                      | 0,04 | 2,8    | 1,48-1,62                     |

**AVVISO:** Per l'analisi della citometria a flusso sono stati utilizzati i seguenti citometri a flusso, inclusa la versione del software:

Per l'analisi della citometria a flusso sono stati utilizzati i seguenti citometri a flusso, inclusa la versione del software:

BD FACSCanto™ II                      BD FACSDiva Software - versione 8.0.2

BD FACSLyric™                        BD FACSSuite Software - versione 1.5

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

Navios EX                                Navios Ex Software v2.0

Per la conta cellulare assoluta è stato utilizzato l'analizzatore ematologico con metodo a doppia piattaforma con le seguenti specifiche:

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

Per la valutazione dei dati misurati è stata utilizzata la seguente piattaforma di analisi:

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

## 12. Prestazioni cliniche

I dati clinici sono stati raccolti in un sito clinico. Le prestazioni cliniche del dispositivo ED7080 sono state determinate confrontando il CD34 QuantiFlowEx Kit con il metodo interno di un laboratorio clinico accreditato. Sono stati analizzati 75 campioni, tra cui sangue periferico, prodotti di leucaferesi e campioni di midollo osseo. La differenza tra i metodi è stata inferiore al 10% in 67 delle 75 determinazioni, il che significa che i risultati ottenuti da entrambi i metodi erano sostanzialmente uguali. Le differenze relative tra i metodi variavano da -13% a +11%. Questi dati sono stati ulteriormente confrontati utilizzando l'analisi di regressione lineare e la valutazione di Bland-Altman dell'accordo tra i metodi (differenza relativa nei conteggi), che ha mostrato un ottimo accordo tra i metodi. Il valore medio delle differenze relative nel conteggio tra i due metodi è dell'1% e un errore standard del 6%.

Le linee guida per la determinazione delle CD34+ HSC suggeriscono di confrontare i risultati con una differenza relativa massima accettabile tra i duplicati fino al 10% <sup>(21)</sup>. Secondo tali raccomandazioni, questi metodi forniscono dati che possono essere considerati uguali tra loro.

## 13. Valori previsti

Il dispositivo è destinato al rilevamento e alla numerazione delle cellule staminali ematopoietiche totali vitali e non stabilisce alcuna diagnosi di per sé, laddove è possibile stabilire un intervallo di valori normale.

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

## 14. Limitazioni

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

I campioni con un numero di WBC molto elevato devono essere diluiti in PBS prima della colorazione per ottenere un numero di leucociti inferiore a  $20 \times 10^3$  cellule/ $\mu\text{l}$  <sup>(22)</sup>.

## 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) 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. Sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni**

La sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni sarà disponibile nel database Eudamed all'indirizzo <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Fino ad allora, la sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni è disponibile su richiesta.

## **17. Uso di marchi di terzi**

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, Trucount™, FlowJo™ sono marchi registrati di Becton, Dickinson and Company, Sysmex XF-1600™ è un marchio registrato di Sysmex Corporation, CD-Chex CD34® è un marchio registrato di Streck, Navios™, Flow-Count™ Fluorospheres è un marchio registrato di Beckman Coulter.

## **18. Cronologia delle revisioni**

Versione 5, ED7080\_IFU\_v5

Nuovo layout IFU secondo i requisiti IVDR (UE) 2017/746. Aggiunta del numero identificativo dell'organismo notificato. Aggiunto il nuovo capitolo 16. Sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni. Modifica del testo della strategia di gating, sono state formulate raccomandazioni per il gating su piattaforma singola. Chiarimento del termine fattore di diluizione. Modifiche ai capitoli 11., 12., 14. e 15. (aggiunta di dati analitici e clinici).

## **19. 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

## **20. Rappresentati autorizzati**

N/A

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