

REDQUANT PNH

Kit per la diagnosi dell' Emoglobinuria Parossistica Notturna su globuli rossi con citometria di flusso

Per l'uso diagnostico in vitro in combinazione con il kit CELLQUANT PNH (Rif. 7201)



Kit da 12 determinazioni

Rif. 7301



1 INTRODUZIONE

L'emoglobinuria parossistica notturna (PNH) è una malattia clonale, acquisita e rara, che si manifesta con una anemia emolitica intravascolare caratterizzata da una lisi dei globuli rossi.

L'PNH è causata da un difetto del gene PIG-A coinvolto nella genesi del glicosil-fosfatidilinositolo (o GPI) che è implicato all'ancoraggio delle proteine alla membrana. CD55 e CD59 sono proteine ancorate mediante GPI e coinvolte nella protezione delle cellule dalla lisi mediata dal complemento. Nella patologia PNH, le cellule sono deficitarie di CD55 e CD59 e sono quindi sensibili alla lisi mediata dal complemento.

2 METODO

Singola analisi citometrica colorimetrica a flusso sui granulociti degli antigeni CD55 e CD59. Il quantitativo relativo ai granulociti deficitari di CD55 e CD59 è determinato con un metodo che stabilisce un limite soglia. La metodica determina una regione di analisi in cui i granulociti deficitari di CD55 e CD59 migrano e possono essere differenziati dai granulociti normali.

3 REAGENTI

- **Reagente 1:** 1 fiala da 15 mL di diluente, 10 volte concentrato.
- **Reagente 2a:** 1 fiala da 240 µL di anticorpo anti CD55 monoclonale.
- **Reagente 2b:** 1 fiala da 240 µL di anticorpo anti CD59 monoclonale.
- **Reagente 3a:** 1 fiala da 480 µL di sfere α precalibrate. Questa sfera è caratterizzata da un valore α per l'interpretazione del deficit di CD55.
- **Reagente 3b:** 1 fiala da 480 µL di sfere β pre-calibrate. Questa sfera è caratterizzata da un valore β per interpretazione del deficit di CD59. I valori α e β sono indicati sull'insero per la valutazione della calibrazione del saggio incluso in ogni kit. I valori α e β possono variare da lotto a lotto.
- **Reagente 4:** 1 fiala da 960 µL di reagente di rivelazione, anticorpo policlonale anti IgG di topo accoppiato al FITC.

Il kit ha fiale e tappi progettati onde evitare le contaminazioni fra reagenti.

4 PRECAUZIONI

- Rispettare le norme di sicurezza di laboratorio.
- Tutti i reagenti contengono sodio azide come conservante e devono essere smaltiti con precauzione. Se si eliminano queste soluzioni nel lavandino, mescolarle a grandi quantità di acqua per evitare la formazione di azidi metalliche che, se concentrate, possono provocare esplosioni.
- Considerare il sangue potenzialmente infettivo.
- Lo smaltimento dei rifiuti sarà effettuato in conformità alla regolamentazione locale vigente.

5 MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO

- Agitatore tipo Vortex.
- Cronometro.
- Centrifuga.
- Citometro.
- Provette per emolisi per citometro.
- Pipette regolabili con puntali monouso (da 10 µL a 1 mL).
- Pipette (1 e 2 mL).
- Acqua distillata

6 RICOSTITUZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Conservati a 2-8 °C nel loro stato originale, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. *

- **Reagente 1 ****
Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C salvo contaminazione.
Preparare una diluizione a 1/10 di acqua distillata. Preparare il volume necessario per la serie da testare.
Stabilità dopo la diluizione: 15 giorni a 2-8°C.
- **Reagenti 2a, 2b e 4**
Pronti per l'uso. Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C salvo contaminazione.

- **Reagenti 3a e 3b**

Dopo l'agitazione con Vortex per 5 secondi, i reagenti sono pronti per l'uso.
Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C salvo contaminazione.

Note

* Non congelare il kit.

** La presenza di una cristallizzazione non altera in nulla la qualità del reagente. Incubare a 37 °C fino a totale dissoluzione dei cristalli.

7 RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

7.1 Prelievo

- Usare provette da prelievo non bagnabili (plastica o vetro siliconato).
- Anticoagulante: EDTA (K₃).

7.2 Trattamento del campione

- Il campione deve essere trattato entro **8 ore** dal prelievo per evitare una caduta di espressione degli antigeni CD55 e CD59.
- Deve essere conservato a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Non congelare il campione.

8 PROCEDURA

Nota: poiché per ognuno dei reagenti il volume usato è minimo, è consigliato pipettarlo sul fondo delle provette.

Tutti i reagenti devono essere a **temperatura ambiente**.

Una sola preparazione di sfere α e β è necessaria per ogni serie da testare. Una serie può contenere fino a 6 campioni.

Raccomandiamo, come controllo qualità, di usare un campione normale e un campione PNH noto da correre parallelamente ad ogni serie di test.

8.1 Preparazione del campione

Prendere una provetta marcata T0.

- Dopo l'omogeneizzazione del campione sanguigno, pipettare **400 µL** di sangue totale nella provetta T0.
- Aggiungere **1,5 mL** di reagente 1 diluito.
- Omogeneizzare la provetta T0 con un agitatore tipo Vortex per **5 secondi**.

8.2 Preparazione delle sfere α e β

Porre in un portaprovette 2 provette di plastica numerate T1 e T2.

Rimettere in sospensione con un agitatore tipo Vortex i reagenti 3a e 3b.

- Nella provetta T1: pipettare **40 µL** di reagente 3a (sfera α).
- Nella provetta T2: pipettare **40 µL** di reagente 3b (sfera β).

8.3 Immuno-marcatura dei campioni

Prendere altre 2 provette numerate T3 e T4.

In ogni provetta T3 e T4:

- pipettare **20 µL** di campione diluito della provetta T0.

Note: Le eventuali gocce di campione, presenti nella parte alta della provetta o sulla sua parete interna, devono essere eliminate per evitare qualsiasi rischio di contaminazione che possa falsare i risultati.

- Nella provetta T3, pipettare **20 µL** di reagente 2a (anti CD55 Mab).
- Nella provetta T4, pipettare **20 µL** di reagente 2b (anti CD59 Mab).
- Omogeneizzare le 2 provette con un agitatore tipo Vortex per **2 secondi**.
- Incubare per **8-12 minuti** a temperatura ambiente.

8.4 Rivelazione

In ognuna delle provette da T1 a T4:

- pipettare **20 µL** di reagente 4;
- omogeneizzare le 4 provette con un agitatore tipo Vortex per **2 secondi**;
- incubare per **8-12 minuti** a temperatura ambiente.
- aggiungere **2 mL** di reagente 1 diluito in ogni provetta T1, T2, T3 e T4.

I campioni così trattati possono essere conservati a **2-8 °C** per al massimo **4 ore** prima dell'analisi citometrica.

8.5 Lettura citometrica

Per effettuare la lettura citometrica, consultare il protocollo di utilizzo dell'apparecchio fornito dal fabbricante.

L'opzione per il calcolo statistico delle medie di fluorescenza è la media geometrica (Mn (x) o GeoMean a seconda del citometro).

Prima dell'analisi, omogeneizzare ogni provetta con un agitatore tipo Vortex.

Il test richiede l'analisi di 10.000 globuli rossi (o sfere) per provetta.

• Analisi delle sfere α e β: provette T1 e T2 (Fig. 1)

Costruire un citogramma FS LOG vs. SS LOG.

Disegnare una finestra di analisi "A" intorno alla popolazione maggioritaria di singlet di sfere α o β (Fig. 1a).

Creare un istogramma FL1 LOG.

Condizionare questo citogramma con la finestra di analisi "A".

Rilevare la media di fluorescenza (MFI) delle sfere α e β sulla totalità dell'istogramma (Figg. 1b e 1c, cursori "B" e "E").

Per condizioni di analisi ottimali, il picco della sfera β deve essere posizionato nella 3ª decade sull'istogramma FL1. Per riuscirci, regolare il voltaggio del fotomoltiplicatore FL1.

Fig. 1a: Citogramma delle sfere α o β

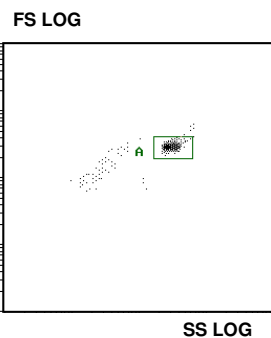


Fig. 1b: Iistogramma della sfera β

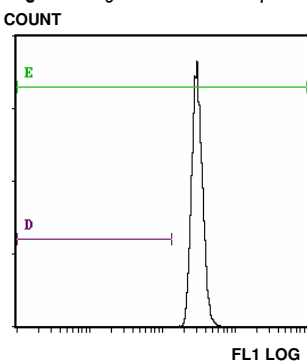
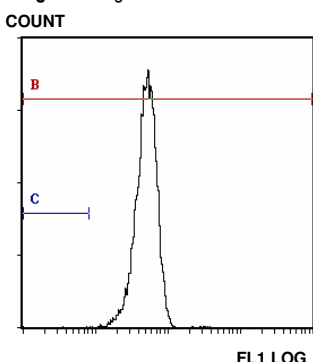


Fig. 1c: Iistogramma della sfera α



• Posizionamento dei cursori di interpretazione (Figg. 1b e 1c)

Su ciascuno dei due istogrammi FL1 LOG condizionati dalla finestra "A", posizionare due cursori "C" e "D", corrispondenti alla localizzazione attesa delle cellule deficitarie, nel seguente modo: l'estremità sinistra del cursore (Min, left) deve essere posizionata nel primo canale e l'estremità destra del cursore (Max, right) ad una intensità di fluorescenza (IF) ottenuta dalle seguenti formule di calcolo:

$$\begin{aligned} \text{CD55 ("C")} & \quad \text{IF}\alpha = \alpha \times \text{MFI Sfera } \alpha \\ \text{CD59 ("D")} & \quad \text{IF}\beta = \beta \times \text{MFI Sfera } \beta \end{aligned}$$

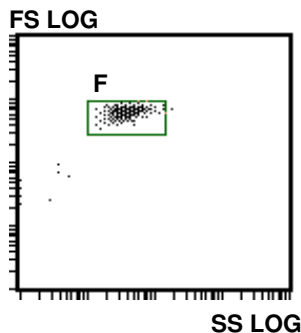
I valori α e β sono indicati sull'inserto per la calibrazione incluso nel kit.

• Analisi dei campioni: provette T3 (CD55) e T4 (CD59) (Fig. 2)

Non cambiare le regolazioni di fluorescenza FL1 LOG (voltaggio del fotomoltiplicatore, PMT FL1) fissate in precedenza.

Sull'istogramma FS LOG vs. SS LOG, isolare la popolazione di globuli rossi di interesse con la finestra di analisi F (Fig. 2).

Fig. 2: Posizionamento della finestra di analisi "F" intorno alla popolazione di globuli rossi



Sull'istogramma FL1 LOG, condizionato dalla finestra di analisi "F" dei globuli rossi.

Provetta T3: rilevare la percentuale di cellule situate nel cursore "C".

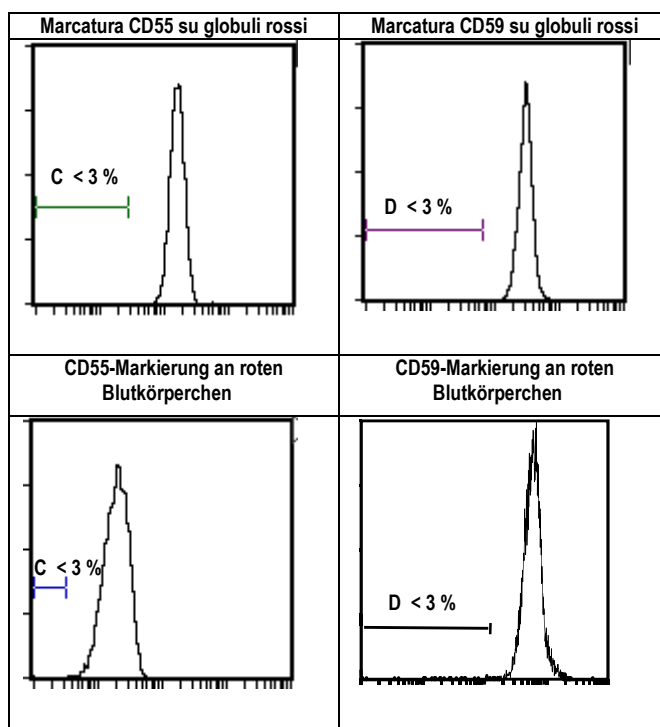
Provetta T4: rilevare la percentuale di cellule situate nel cursore "D".

9 RISULTATI E INTERPRETAZIONE DEL TEST

Nota: il test è applicabile solo per una espressione delle intensità di fluorescenza in unità lineari e non in numero di canale.

Seguendo le procedure suggerite per dei campioni senza clone deficitari, i cursori "C" e "D" non contengono più del 3% di cellule.

Esempio di marcature CD55 e CD59 su globuli rossi e granulociti (campione normale)

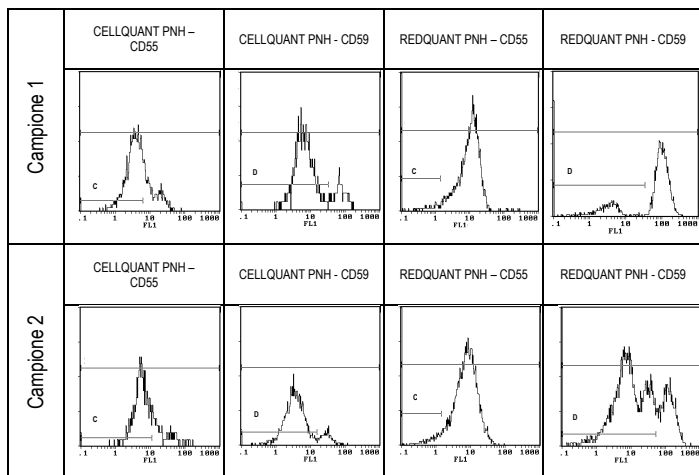


Interpretazione del test

N. parametri > 3 %	REDQUANT PNH		CELLQUANT PNH		Conclusione
	CD55	CD59	CD55	CD59	
4	> 3 %	> 3 %	> 3 %	> 3 %	PNH
3	> 3 %	> 3 %	> 3 %	< 3 %	PNH
3	> 3 %	> 3 %	< 3 %	> 3 %	PNH
3	< 3 %	> 3 %	> 3 %	> 3 %	PNH
3	> 3 %	< 3 %	> 3 %	> 3 %	PNH
2	> 3 %	> 3 %	< 3 %	< 3 %	PNH
2	< 3 %	< 3 %	> 3 %	> 3 %	PNH
2	< 3 %	> 3 %	< 3 %	> 3 %	Non PNH
2	< 3 %	> 3 %	> 3 %	< 3 %	Non PNH
2	> 3 %	< 3 %	> 3 %	< 3 %	Non PNH
2	> 3 %	< 3 %	< 3 %	> 3 %	Non PNH
1	> 3 %	< 3 %	< 3 %	< 3 %	Non PNH
1	< 3 %	> 3 %	< 3 %	< 3 %	Non PNH
1	< 3 %	< 3 %	> 3 %	< 3 %	Non PNH
1	< 3 %	< 3 %	< 3 %	> 3 %	Non PNH
0	< 3 %	< 3 %	< 3 %	< 3 %	Normale

- a - Se 3 o 4 parametri / 4 sono > 3%, il campione viene dichiarato **PNH**.
- b - Se 2 parametri CD55 e CD59 su una stessa popolazione (o granulociti o globuli rossi) sono > 3% allora il campione è dichiarato **PNH**.
- c - Se 2 parametri / 4 sono > 3% (diversi dai casi b precedenti) o 1 parametro / 4 è > 3%, il campione non è dichiarato PNH. Si raccomanda di fare un test di conferma in tempi ravvicinati.
- d - Se 0 parametro / 4 è > 3%, il campione è normale.

Esempio di marcature CD55 e CD59, su due campioni PNH, su globuli rossi e granulociti



10 LIMITI DEL KIT

10.1 Microcitosi

Alcuni campioni che presentano una microcitosi (globuli rossi piccoli) genereranno percentuali di cellule deficitarie > 3% in modo artefatto.

10.2 Trasfusione

I pazienti che hanno ricevuto di recente una trasfusione non possono essere testati con il kit REDQUANT PNH. La trasfusione infatti maschera la potenziale mancanza di CD55 e/o CD59 e può generare un risultato di falso negativo (campione dichiarato falsamente normale).

11 PERFORMANCE

Il test è convalidato per gli strumenti Becton Dickinson tipo FACScan e Beckman Coulter tipi XL e XL MCL (software system II).

11.1 Sensibilità (per l'uso combinato dei kit REDQUANT PNH e CELLQUANT PNH): 100 %

I 23 campioni PNH sono stati confermati PNH durante l'uso combinato dei kit CELLQUANT PNH e REDQUANT PNH (3).

11.2 Limite di rilevamento

00% di cellule deficitarie di CD55 e di CD59.

11.3 Range di misura

Dallo 0% al 24,8% di cellule deficitarie di CD55.
Dallo 0,1% al 58% di cellule deficitarie di CD59.

11.4 Ripetibilità del test

4 campioni normali trattati 5 volte con lo stesso kit.

Tutti i test presentano percentuali di cellule deficitarie di CD55 e CD59 inferiori al 3%.

11.5 Riproducibilità nel lotto

Un campione normale trattato con 6 differenti kit dello stesso lotto.

Tutti i test danno percentuali di cellule deficitarie di CD55 e CD59 inferiori al 3%.

12 CAUSE DI ERRORE

Problemi osservati	Cause probabili	Soluzioni possibili
Su un campione normale, la marcatura per le provette CD55 e CD59 (> 3% di cellule deficitarie) appare equivalente al rumore di fondo	Si sono usati 20 µL di sangue totale anziché 20 µL di sangue totale diluito. Gli Mab non sono allora più in condizione saturante.	Ripetere il test badando di diluire il campione di sangue.
Su un campione normale, la marcatura della provetta CD55 e/o CD59 (> 3% di cellule deficitarie) appare equivalente al rumore di fondo	È stato dimenticato il reagente anticorpo R2a e/o R2b.	Ripetere il test facendo in modo di depositare bene tutti i reagenti.
Su un campione normale, è osservata una marcatura equivalente sia sulle sfere che sui globuli rossi	È stato dimenticato il reagente R4.	Ripetere il test facendo in modo di depositare bene il reagente.
Poche o nessuna sfera α e/o β viene rilevata sull'istogramma FS Log vs. SS Log	Non ottimale risospensione delle sfere α e/o β.	Passare nell'agitatore per almeno 5 secondi prima di aprire e pipettare il reagente R3a e/o il reagente R3b.
Su un campione normale, più del 3% di cellule deficitarie di CD55 sono rilevate e il picco CD59 è lontano dal cursore "C".	I parametri di interesse CD55 e CD59 sono stati interpretati con i cursori sbagliati ("C" o "D").	Attribuire bene il cursore "C" a CD55 e il cursore "D" a CD59.

13 RESPONSABILITÀ

L'uso *in vitro* è valido per diagnosi unicamente con una rigorosa applicazione del foglio illustrativo e dell'uso combinato dei kit CELLQUANT PNH e REDQUANT PNH. Qualsiasi modifica o cambiamento, nonché l'uso di reagenti di altri lotti, può influenzare i risultati dei test. In tal caso, non sarà accettata nessuna contestazione o sostituzione del prodotto.

14 BIBLIOGRAFIA

- 1 - KISHIMOTO T. *et al.*, Leucocyte Typing VI, Garland Publishing Inc, White Cell Differentiation Antigens. 1996, 519-520, 521-522.
- 2 - SCHLOSSMAN SF. *et al.*, Leucocyte Typing V, Oxford University Press, White Cell Differentiation Antigens. 1995, 1468-1471.
- 3 - OELSCHLAEGEL U. *et al.*, Clin Lab Haem. 2001, 23: 81-90.

15 SIMBOLI

REF	Numero di catalogo	Utilizzare entro
IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Limiti di temperatura	LOT
	Fabbricante	



140 CH. DE L'ARMÉE D'AFRIQUE
13010 MARSIGLIA
FRANCIA

TEL: +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX: +33 (0) 4 91 47 24 71

Versione Dicembre 2018