

REDQUANT HPN

Kit para diagnóstico da Hemoglobinúria Paroxística Nocturna em glóbulos vermelhos por citometria em fluxo

Para Utilização no Diagnóstico In Vitro em combinação com o dispositivo CELLQUANT HPN (Ref. 7201)



Dispositivo para 12 determinações

Ref. 7301



BioCytex

1 INTRODUÇÃO

A Hemoglobinúria Paroxística Nocturna (HPN) é uma doença clonal, adquirida e rara, que se manifesta por uma anemia hemolítica intravascular, caracterizada por uma lise dos glóbulos vermelhos.

A HPN resulta de um defeito do gene PIG-A ao impedir a síntese de glicosil-fosfatidilinositol (ou GPI), necessária para permitir a ligação à membrana de determinadas proteínas. O CD55 e o CD59 são moléculas GPI-ligadas que intervêm na protecção das células contra a lise produzida pelo complemento. Na HPN, as células apresentam um defeito em CD55 e CD59, ficando, por isso, sensíveis à acção do complemento.

2 MÉTODO

Análise citométrica simple-cor dos antígenos CD55 e CD59 à superfície dos glóbulos vermelhos. A proporção relativa de glóbulos vermelhos deficientes em CD55 e CD59 é determinada por esferas pré-calibradas que asseguram o posicionamento de um limiar. Este método estabelece uma região de análise na qual os glóbulos vermelhos deficientes em CD55 e CD59 migram e podem ser diferenciados dos glóbulos vermelhos normais.

3 REAGENTES

- **Reagente 1:** 1 frasco de 15 ml de diluente, 10 vezes concentrado.
- **Reagente 2a:** 1 frasco de 240 µl de AcM anti CD55.
- **Reagente 2b:** 1 frasco de 240 µl de AcM anti CD59.
- **Reagente 3a:** 1 frasco de 480 µl de esfera α pré-calibrada. Esta esfera é caracterizada por um valor α de interpretação do defeito em CD55.
- **Reagente 3b:** 1 frasco de 480 µl de esfera β pré-calibrada. Esta esfera é caracterizada por um valor β de interpretação do defeito em CD59. Os valores α e β estão indicados na etiqueta de calibração incluída em cada dispositivo. Os valores α e β podem variar de lote para lote.
- **Reagente 4:** 1 frasco de 960 µl de reagente de revelação, anticorpo policlonal anti IgG de ratinho, ligado a FITC.

Para evitar contaminações inter-reagentes, o suporte apresenta entalhes para colocar as tampas.

4 PRECAUÇÕES

- Respeitar as boas práticas de laboratório.
- Todos os reagentes contêm azida de sódio como conservante, pelo que devem ser eliminados com precaução. Para eliminar tais soluções na canalização, é necessário misturá-las com grandes quantidades de água, por forma a evitar a formação de azidas metálicas que, quando concentradas, podem provocar explosões.
- O sangue deve ser considerado como potencialmente infeccioso.
- A eliminação dos resíduos deve processar-se em conformidade com a regulamentação local em vigor.

5 MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Agitador tipo Vortex.
- Cronómetro.
- Citómetro.
- Tubos de hemólise para citómetro.
- Pipetas reguláveis com ponta descartável (21 µl a 1 ml).
- Pipetas (1 e 2 ml).
- Água destilada.

6 RECONSTITUIÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

Quando conservados a 2-8°C na embalagem de origem, os reagentes mantêm-se estáveis até ao termo do prazo de validade indicado na embalagem.*

- **Reagente 1 **:**
Estabilidade após abertura: 2 meses a 2-8°C na ausência de qualquer contaminação.
Preparar uma diluição a 1/10 em água destilada. Preparar o volume necessário para a série a testar.
Estabilidade após diluição: 15 dias a 2-8°C.

- **Reagentes 2a, 2b e 4:**

Prontos a usar.

Estabilidade após abertura: 2 meses a 2-8°C na ausência de qualquer contaminação.

- **Reagentes 3a e 3b:**

Após agitação por vortex durante 5 segundos, os reagentes estão prontos a usar.
Estabilidade após abertura: 2 meses a 2-8°C na ausência de qualquer contaminação.

Notas: * Não congelar o dispositivo.

** A presença de uma cristalização não altera em nada a qualidade do reagente. Incubar a 37 °C até total dissolução dos cristais.

7 RECOLHA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

7.1 Colheita:

- Utilizar tubos de colheita não molháveis (plástico ou vidro com silicose)
- Anticoagulante: EDTA (K₃)

7.2 Conservação da amostra:

- A amostra deve ser processada nas **8 horas** seguintes à colheita para evitar uma quebra de expressão dos antígenos CD55 e CD59.
- Deve ser conservada à temperatura ambiente (18-25°C).
- Não congelar a amostra.

8 PROCEDIMENTO

Nota: Para cada um dos reagentes, dado que o volume utilizado é muito reduzido, é imperativo depositá-lo no fundo dos tubos. Todos os reagentes devem estar à **temperatura ambiente**.

Uma preparação de esferas α e β é necessária para cada série a testar. Uma série pode conter até 6 amostras.

Como controlo de qualidade, recomendamos a utilização de uma amostra normal e de uma amostra conhecida HPN para passar em paralelo em cada série de testes.

8.1 Preparação da amostra:

Tomar um tubo designado como T0.

- Após homogeneização da amostra sanguínea, pipetar **10 µl** de sangue total no tubo T0.
- Adicionar **1,5 ml** de reagente 1 diluído.
- Homogeneizar o tubo T0 por meio de um agitador de tipo Vortex durante **5 segundos**.

8.2 Preparação das esferas α e β :

Num suporte, dispor 2 tubos identificados como T1 e T2.

Colocar de novo em suspensão por vortex os reagentes 3a e 3b.

- No tubo T1: pipetar **40 µl** de reagente 3a (esfera α).
- No tubo T2: pipetar **40 µl** de reagente 3b (esfera β).

8.3 Determinação imunológica das amostras:

Tomar outros 2 tubos identificados como T3 e T4.

Em cada um dos tubos T3 e T4:

- Pipetar **20 µl** da amostra diluída retirada do tubo T0.

Nota: Qualquer gota de amostra presente no cimo do tubo ou na sua parede interna deve ser eliminada para evitar o risco de contaminação que possa falsear os resultados.

- No tubo T3, pipetar **20 µl** de reagente 2a (AcM anti CD55).
- No tubo T4, pipetar **20 µl** de reagente 2b (AcM anti CD59).
- Homogeneizar os 2 tubos por meio de um agitador de tipo Vortex durante **2 segundos**.
- Incubar **8-12 minutos** à temperatura ambiente.

8.4 Revelação:

Em cada um dos tubos T1 a T4:

- Distribuir **20 µl** de reagente 4.
- Homogeneizar os 4 tubos por meio de um agitador de tipo Vortex durante **2 segundos**.
- Incubar **8-12 minutos** à temperatura ambiente.
- Adicionar **2 ml** de reagente 1 diluído em cada tubo T1, T2, T3 e T4.

As amostras assim preparadas podem ser conservadas a 2-8°C durante **4 horas** no máximo, antes da análise citométrica.

8.5 Leitura citométrica:

Para efectuar a leitura citométrica, consultar o protocolo de utilização do aparelho, fornecido pelo fabricante.

A opção para o cálculo estatístico das médias de fluorescência é a média geométrica (Mn (x) ou GeoMean, conforme o citómetro).

Antes da análise, homogeneizar cada tubo por meio de um agitador de tipo Vortex.

O teste requer a análise de 10.000 glóbulos vermelhos (ou esferas) por tubo.

• Análise das esferas α e β: tubos T1 e T2 (Figs. 1)

Criar um citograma FS LOG vs SS LOG.

Desenhar uma janela de análise "A" em volta da população maioritária de singletos de esferas α ou β (Fig. 1a).

Criar um histograma FL1 LOG.

Limitar este histograma pela janela de análise "A".

Determinar a média de fluorescência (MFI) das esferas α e β na totalidade do histograma (Figs. 1b e 1c, cursores "B" e "E").

Para dispor das condições de análise ideais, o pico da esfera β deve ser posicionado na 3ª década, no histograma FL1. Para isso, regular a tensão do fotomultiplicador FL1.

Fig. 1a: Citograma das esferas α ou β

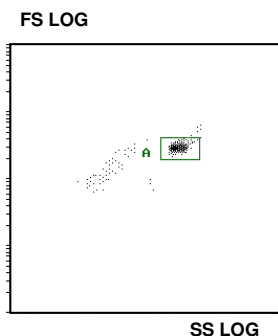


Fig. 1b : Histograma da esfera β

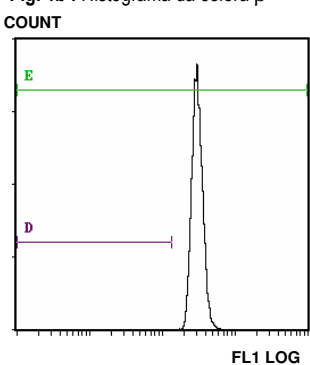
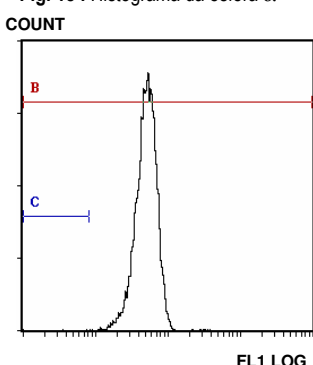


Fig. 1c : Histograma da esfera α



• Posicionamento dos cursores de interpretação (Figs. 1b e 1c)

Em cada um dos histogramas FL1 LOG limitados pela janela "A", posicionar dois cursores "C" e "D", correspondendo à localização prevista das células deficientes, como segue: a extremidade esquerda do cursor (Min, left) deve ficar posicionada no primeiro canal e a extremidade direita do cursor (Max, right) a uma intensidade de fluorescência (IF) obtida pelas fórmulas de cálculo seguintes:

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

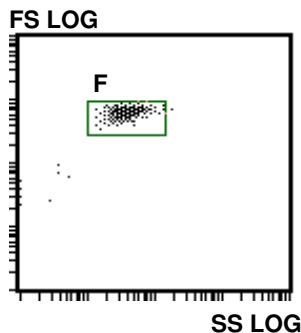
Os valores α e β estão indicados na etiqueta de calibração incluída no dispositivo.

• Análise das amostras: tubos T3 (CD55) e T4 (CD59) (Fig. 2)

Não alterar as definições de fluorescência FL1 LOG (tensão do fotomultiplicador, PMT FL1) anteriormente fixadas.

No histograma FS LOG vs SS LOG, isolar a população de glóbulos vermelhos de interesse pela janela de análise F (Fig. 2).

Fig. 2 : Posicionamento da janela de análise "F" em volta da população de glóbulos vermelhos



No histograma FL1 LOG, limitado pela janela de análise "F" dos glóbulos vermelhos:

Tubo T3: determinar a percentagem de células situadas no cursor "C"

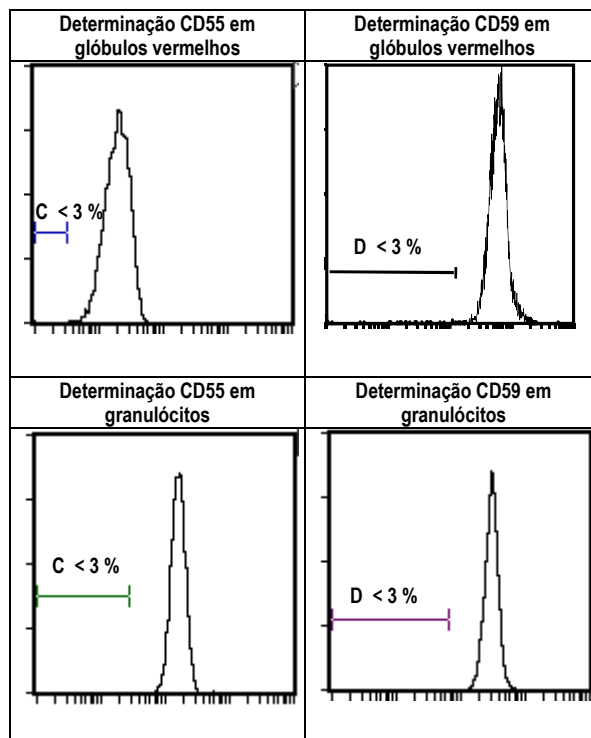
Tubo T4: determinar a percentagem de células situadas no cursor "D".

9 RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO DO TESTE

Nota: O teste só é aplicável para uma expressão das intensidades de fluorescência em unidades lineares e não em número de canal.

Seguindo os procedimentos sugeridos para amostras sem clone deficiente, os cursores "C" e "D" não contêm mais de 3% de células.

Exemplo de determinações CD55 e CD59 em glóbulos vermelhos e granulócitos (amostra normal):

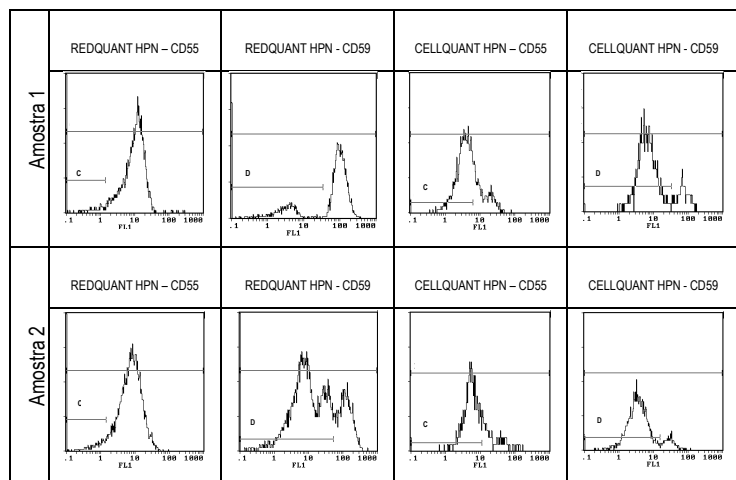


Interpretação do teste:

Nº parâmetros > 3%	REDQUANT HPN		CELLQUANT HPN		Conclusão
	CD55	CD59	CD55	CD59	
4	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%	HPN
3	> 3%	> 3%	> 3%	< 3%	HPN
3	> 3%	> 3%	< 3%	> 3%	HPN
3	< 3%	> 3%	> 3%	> 3%	HPN
3	> 3%	< 3%	> 3%	> 3%	HPN
2	> 3%	> 3%	< 3%	< 3%	HPN
2	< 3%	< 3%	> 3%	> 3%	HPN
2	< 3%	> 3%	< 3%	> 3%	Não HPN
2	< 3%	> 3%	> 3%	< 3%	Não HPN
2	> 3%	< 3%	> 3%	< 3%	Não HPN
2	> 3%	< 3%	< 3%	> 3%	Não HPN
1	> 3%	< 3%	< 3%	< 3%	Não HPN
1	< 3%	> 3%	< 3%	< 3%	Não HPN
1	< 3%	< 3%	> 3%	< 3%	Não HPN
1	< 3%	< 3%	< 3%	> 3%	Não HPN
0	< 3%	< 3%	< 3%	< 3%	Normal

- a- Se 3 ou 4 parâmetros / 4 forem > 3%, a amostra é declarada **HPN**.
- b- Se 2 parâmetros CD55 e CD59 numa mesma população (granulócitos ou glóbulos vermelhos) forem > 3%, então a amostra é declarada **HPN**.
- c- Se 2 parâmetros / 4 forem > 3%, (diferentes dos casos b acima) ou 1 parâmetro / 4 for > 3%, a amostra não é declarada HPN. Recomenda-se proceder a um teste de confirmação dentro de um curto espaço de tempo.
- d- Se 0 parâmetros / 4 forem > 3%, a amostra é normal.

Exemplo de determinações CD55 e CD59 em duas amostras HPN, em glóbulos vermelhos e granulócitos:



10 LIMITAÇÕES DO DISPOSITIVO

10.1 Microcitose:

Amostras apresentando uma microcitose (glóbulos vermelhos de pequenas dimensões) vão gerar percentagens de células deficientes > 3% como artefacto.

10.2 Transusão:

Doentes que tenham recebido recentemente uma transfusão não podem ser testados pelo dispositivo REDQUANT HPN. Efectivamente, como a transfusão dissimula a potencial deficiência em CD55 e/ou CD59, pode dar origem a um resultado falsamente negativo (amostra falsamente declarada normal).

11 DESEMPENHOS

O teste é validado para instrumentos Becton Dickinson tipo FACScan e Beckman Coulter tipos XL e XL MCL (software system II).

11.1 Sensibilidade (para utilização combinada dos dispositivos CELLQUANT HPN e REDQUANT HPN): 100%

As 23 amostras HPN foram confirmadas HPN na utilização combinada dos dispositivos CELLQUANT HPN e REDQUANT HPN ⁽³⁾.

11.2 Limite de detecção:

0% de células deficientes em CD55 e em CD59.

11.3 Domínio de medição:

De 0% a 24,8% de células deficientes em CD55.

De 0,1% a 58% de células deficientes em CD59.

11.4 Repetibilidade do teste:

4 amostras normais testadas 5 vezes com o mesmo dispositivo.

Todos os testes forneceram percentagens de células deficientes em CD55 e em CD59 inferiores a 3%.

11.5 Reprodutibilidade dentro do lote:

Uma amostra normal testada com 6 dispositivos diferentes aleatoriamente retirados do lote.

Todos os testes forneceram percentagens de células deficientes em CD55 e em CD59 inferiores a 3%.

12 CAUSAS DE ERRO

Problemas observados	Causas prováveis	Soluções possíveis
Numa amostra normal, uma determinação equivalente ao ruído de fundo aparece no tubo CD55 e/ou CD59 (> 3% de células deficientes)	Foram utilizados 20 µl de sangue total em vez de 20 µl de sangue total diluído. Os AcMx deixam assim de estar em condição de saturação.	Repetir a manipulação tendo o cuidado de diluir a amostra de sangue.
Numa amostra normal, uma determinação equivalente ao ruído de fundo aparece para o tubo CD55 e/ou CD59 (> 3% de células deficientes)	Foi esquecido o reagente anticorpos R2a e/ou R2b	Repetir a manipulação tendo o cuidado de depositar correctamente todos os reagentes.
Numa amostra normal, uma determinação equivalente nas esferas e nas células	Foi esquecido o reagente R4	Repetir a manipulação tendo o cuidado de depositar correctamente o reagente.
Poucas ou nenhuma esfera α e/ou β foram detectadas no histogramas FS Log vs SS Log	Re-suspensão incorrecta das esferas α e/ou β	Ter o cuidado de homogeneizar durante um mínimo de 5 segundos, antes da abertura e pipetagem do reagente R3a e/ou do reagente R3b
Numa amostra normal, mais de 3% de células deficientes em CD55 foram detectadas e o pico CD59 está longe do cursor "C"	Os parâmetros de interesse CD55 e CD59 foram interpretados com cursores errados ("C" ou "D")	Atribuir correctamente o cursor "C" ao CD55 e o cursor "D" ao CD59

13 RESPONSABILIDADE

A utilização em diagnóstico *in vitro* só é válida em rigorosa aplicação das instruções e em utilização combinada dos dispositivos CELLQUANT HPN e REDQUANT HPN. Qualquer modificação ou alteração, bem como a utilização de reagentes de outros lotes pode influenciar os resultados dos testes. Nestas circunstâncias não será aceite qualquer reclamação ou substituição do produto.

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 SÍMBOLOS

REF	Referência de catálogo	Prazo de validade
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Conteúdo suficiente para "n" testes
Limites de temperatura	LOT	Código do lote
Fabricante		



140 CH. DE L'ARMÉE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE

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

Versão Dezembro de 2018