

## CELLQUANT PNH

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

Per l'uso diagnostico in vitro in combinazione  
con il kit REDQUANT PNH (Rif. 7301)



Kit da 12 determinazioni

Rif. 7201



Nei Paesi non aderenti all'Unione Europea il Prodotto è destinato esclusivamente ad uso ricerca.

### 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 300 µL, anti CD55, anticorpo monoclonale.
- **Reagente 2b:** 1 fiala da 300 µL, anti CD59, anticorpo monoclonale.
- **Reagente 3a:** 1 fiala da 600 µL di sfere αβ precalibrate. Questa sfera è caratterizzata da valori di α e β, per l'interpretazione dei deficit rispettivamente di CD55 e CD59. I valori α e β sono indicati sull'inserito per la valutazione della calibrazione del saggio incluso in ogni kit. I valori α e β possono variare da lotto a lotto.
- **Reagente 3b:** 1 fiala da 300 µL di reagente di saturazione.
- **Reagente 4:** 1 fiala da 900 µL di reagente di rivelazione, anticorpo policlonale anti IgG di topo accoppiato al FITC.
- **Reagente 5:** 3 file da 3,2 mL di soluzione per la lisi dei globuli rossi.

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 del sodio azide come conservante e devono essere smaltiti con precauzione. Se si eliminano queste soluzioni nel lavandino, diluirle con 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.
- Provette da 15 mL.
- Pipette regolabili con puntali monouso (da 20 µL a 1 mL).
- Pipette graduate (1, 2, 10 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 se privo di qualsiasi contaminazione.  
Preparare una diluizione a 1/10 di acqua distillata.  
Stabilità dopo la diluizione: 15 giorni a 2-8°C.  
Preparare il volume necessario per la serie da testare.

- **Reagenti 2a, 2b, 3b, 4 e 5**

Pronti all'uso. Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C se privi di qualsiasi contaminazione.

- **Reagente 3a**

Dopo l'agitazione con Vortex per 5 secondi, il reagente è pronto per l'uso. Stabilità dopo l'apertura: 2 mesi a 2-8°C al di fuori di qualsiasi 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 (K<sub>3</sub>).

#### 7.2 Trattamento del campione

- Il campione deve essere trattato entro **8 ore** dal prelievo per limitare la degranulazione dei granulociti.
- 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 in fondo alle provette. Tutti i reagenti devono essere a **temperatura ambiente**.

Per ogni serie da testare è necessario un solo preparato di sfere αβ. Una serie può contenere fino a 6 campioni.

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

#### 8.1 Preparazione del campione

- In una provetta da 15 mL marcata T0, pipettare **800 µL** di **reagente 5** (lisi).
- Aggiungere **7,2 mL** di acqua distillata conservata a temperatura ambiente.
- Omogeneizzare la provetta con un agitatore tipo Vortex per **5 secondi**.
- Dopo l'omogeneizzazione del campione sanguigno, pipettare **400 µL** di sangue totale nella provetta T0.

**Nota:** 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 da parte dei globuli rossi non lisati che possono falsare i risultati.

- Omogeneizzare la provetta con un agitatore tipo Vortex per **5 secondi**.
- Incubare per **8-12 minuti** a temperatura ambiente.
- Centrifugare **5 minuti a 300 g**.
- Eliminare il supernatante.
- Aggiungere **2 mL** di **reagente 1 diluito** (diluente).
- Risospendere il sedimento cellulare con un agitatore tipo Vortex.
- Centrifugare **5 minuti a 300 g**.
- Svuotare la provetta T0 mediante capovolgimento e aspirare il resto del supernatante.
- Verificare visivamente la presenza del sedimento cellulare sul fondo della provetta.
- Risospendere il sedimento cellulare nella pipetta aggiungendo **150 µL** di **reagente 1 diluito**.
- Omogeneizzare la provetta con un agitatore tipo Vortex per **2 secondi**.

Osservazione: su alcuni campioni si può osservare una lisi incompleta dei globuli rossi. In tal caso si raccomanda di preriscaldare a 37°C l'acqua distillata usata per diluire la lisi.

## 8.2 Preparazione della sfera $\alpha\beta$

Prendere una provetta in plastica marcata T1.

- Dopo la rimessa in sospensione con l'agitatore Vortex del reagente 3a, pipettare **50  $\mu$ L** del reagente 3a (sfera  $\alpha\beta$ ) nella provetta T1 e aggiungere **25  $\mu$ L** di **reagente 3b** (reagente di saturazione).
- Omogeneizzare la provetta con un agitatore tipo Vortex per **2 secondi**.

## 8.3 Immuno-marcatore del campione

Sistemare 2 provette di plastica numerate T2 e T3 su un depositore.

In ogni provetta T2 e T3:

- pipettare **50  $\mu$ L** di sospensione cellulare della provetta T0;
- nella provetta T2, pipettare **25  $\mu$ L** di **reagente 2a** (Mab anti CD55);
- nella provetta T3, pipettare **25  $\mu$ L** di **reagente 2b** (Mab anti CD59);
- 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 3 provette T1, T2 e T3:

- Pipettare **25  $\mu$ L** di **reagente 4** (reagente di rivelazione);
- omogeneizzare le 3 provette con un agitatore tipo Vortex per **2 secondi**;
- incubare per **8-12 minuti** a temperatura ambiente;
- pipettare **3 mL** di **reagente 1 diluito** in ogni provetta.

I campioni così trattati possono essere conservati a **2-8°C** per **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 5.000 granulociti (o sfere) per provetta.**

### • Analisi della sfera $\alpha\beta$ : provetta T1 (Fig. 1).

Costruire un citogramma FS vs. SS.

Disegnare una finestra di analisi "A" intorno alla popolazione di sfere  $\alpha\beta$  (Fig. 1a).

Creare un istogramma FL1 LOG.

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

Rilevare la media di fluorescenza (MFI) dell'istogramma della sfera  $\alpha\beta$  (Fig. 1b), sulla totalità della popolazione (cursore "B").

**Per condizioni di analisi ottimali, il picco della sfera  $\alpha\beta$  deve essere posizionato in FL1 nella 3ª decade. Per riuscirci, regolare il voltaggio del fotomoltiplicatore FL1.**

Fig. 1a: Citogramma della sfera  $\alpha\beta$

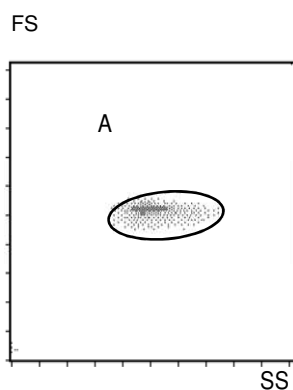
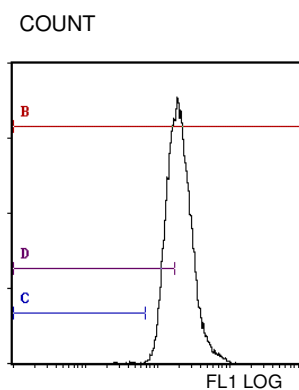


Fig. 1b: Istogramma della sfera  $\alpha\beta$



### • Posizionamento dei cursori di interpretazione (Fig. 1b)

Sull'istogramma FL1 LOG condizionato 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:

$$\text{CD55 ("C")} \quad \text{IF}\alpha = \alpha \times \text{MFI Sfera } \alpha\beta$$

$$\text{CD59 ("D")} \quad \text{IF}\beta = \beta \times \text{MFI Sfera } \alpha\beta$$

I valori  $\alpha$  e  $\beta$  sono indicati sull'inserito per la calibrazione inclusa nel kit.

### • Analisi dei campioni: provette T2 (CD55) e T3 (CD59) (Fig. 2)

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

**Le regolazioni di guadagno in side scatter (SS) devono essere adattate per isolare, sul citogramma FS vs. SS, la popolazione granulocitaria di interesse (finestra di analisi "A", Fig. 2a).**

La finestra di analisi A sarà preferibilmente ellissoidale e ristretta alla parte densa della nube per evitare l'inclusione di cellule non granulocitarie (ad esempio dei monociti).

Sull'istogramma FL1 LOG, condizionato dalla finestra di analisi A dei granulociti:

Provetta T2: rilevare la percentuale di cellule situate nel cursore C,

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

Fig. 2a: Posizionamento della finestra A intorno alla popolazione di granulociti

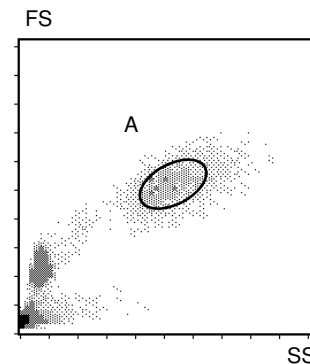
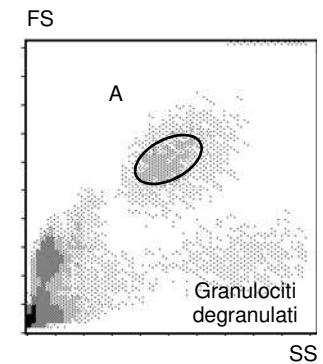


Fig. 2b: Posizionamento della finestra A intorno alla popolazione di granulociti non degranulati



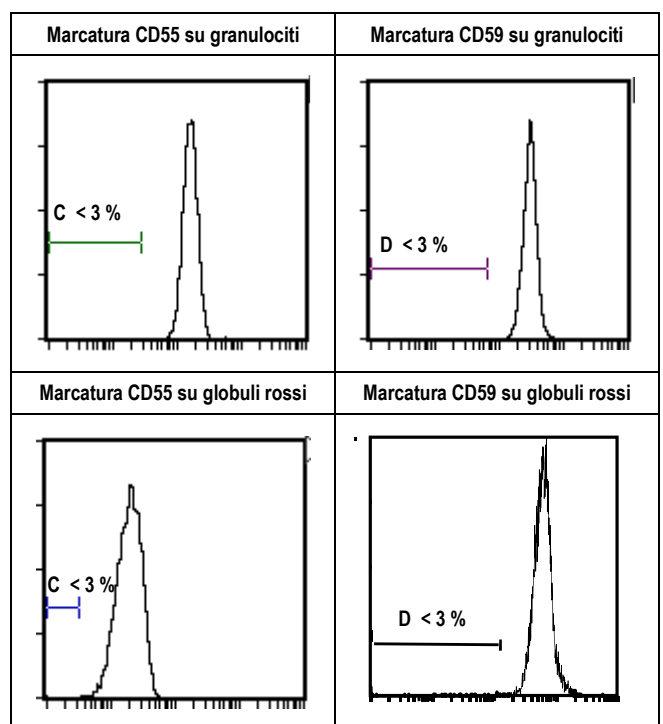
Nota: l'invecchiamento del campione si traduce nella comparsa di una sub-popolazione granulocitaria di dimensioni inferiori (Fig. 2b). È necessario posizionare la finestra di analisi A sui granulociti nativi non degranulati.

## 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 granulociti e globuli rossi (campione normale)**



## Interpretazione del test

N. parametri > 3%	CELLQUANT PNH		REDQUANT PNH		Conclusioni
	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

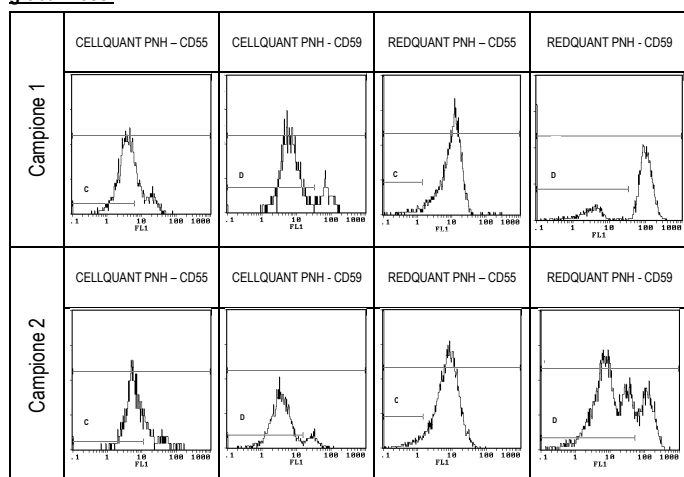
a - Se 3 o 4 parametri / 4 sono > 3%, il campione viene dichiarato **PNH**.

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 granulociti e globuli rossi



## 10 LIMITI DEL KIT

In alcuni campioni si può osservare una lisi incompleta. Ciò può comportare un risultato falsamente positivo sul CD59 (> 3% di cellule deficitarie) dovuto al fissaggio dell'anticorpo CD59 ai globuli rossi residui.

## 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 CELLQUANT PNH e REDQUANT PNH): 100%

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

### 11.2 Limite di rilevamento

0% di cellule deficitarie di CD55 e di CD59.

## 11.3 Range di misura

Dallo 0% al 98,8% di cellule deficitarie di CD55.

Dallo 0% al 99,9% di cellule deficitarie di CD59.

## 11.4 Ripetibilità del test

4 campioni normali trattati 5 con lo stesso kit.

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

## 11.5 Riproducibilità nel lotto

Un campione normale trattato con 6 kit diversi presi a caso nel lotto.

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

## 12 Problematiche

Problemi osservati	Cause probabili	Soluzioni possibili
Su un campione normale, il CD59 è > 3%	Lisi dei globuli rossi non ottimale	Periscaldare l'acqua distillata a 37°C per diluire la lisi
Su un campione normale, una marcatura equivalente al rumore di fondo appare per la provetta CD55 e/o CD59 (> 3% di cellule deficitarie)	Non è stato aggiunto il reagente R2a e/o R2b	Ripetere il test facendo in modo di depositare bene tutti i reagenti
Su un campione normale, una marcatura corrispondente al rumore di fondo è riscontrata sulle sfere e sulle cellule (> 3% di cellule deficitarie)	Non è stato aggiunto il reagente R4	Ripetere il test facendo in modo di depositare bene il reagente
Poche o nessuna sfera αβ sono rilevate sull'istogramma FS vs. SS	Non ottimale risospensione delle sfere αβ	Passare nell'agitatore per almeno 5 secondi prima di aprire e pipettare il reagente R3a
Dopo l'analisi delle sfere, i granulociti non sono individuati sull'istogramma FS vs. SS	Il PMT SS non è ben regolato	Aumentare il guadagno sul SS per ottimizzare il posizionamento della popolazione granulocitaria
La nube di granulociti è eterogenea e il CD55 e/o il CD59 sono > 3% su un campione normale	Il campione è stato prelevato da più di 8 ore e i granulociti sono degranulati	Posizionare la finestra di analisi "A" sulla nube di granulociti non degranulati. La finestra di analisi "A" sarà preferibilmente ellissoidale e ristretta alla parte densa della nube per evitare l'inclusione di cellule non granulocitarie
Su un campione normale, oltre il 3% di cellule deficitarie di CD55 sono rilevate e il piccolo 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* per diagnosi è valido unicamente con la rigorosa applicazione del foglio illustrativo e con l'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

<b>REF</b>	Numero di catalogo		Utilizzare entro
<b>IVD</b>	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Limiti di temperatura	<b>LOT</b>	Codice del lotto
	Fabbricante		



140, CHEMIN DE L'ARMEE D'AFRIQUE  
13010 MARSIGLIA

FRANCIA

TEL: +33 (0) 4 96 12 20 40

FAX: +33 (0) 4 91 47 24 71

Versione ottobre 2017