

CELLQUANT HPN

Kit para diagnóstico da Hemoglobinúria Paroxística Nocturna em granulócitos por citometria em fluxo

Para utilização no Diagnóstico In Vitro em combinação com o dispositivo REDQUANT HPN (Ref. 7301)



Dispositivo para 12 determinações

Ref. 7201

Fora da Europa, este produto destina-se exclusivamente a investigação.

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 (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 granulócitos. A proporção relativa de granulócitos deficientes em CD55 e CD59 é determinada por um método que fixa um limiar. O método estabelece uma região de análise na qual os granulócitos deficientes em CD55 e CD59 migram e podem ser diferenciados dos granulócitos normais.

3 REAGENTES

- **Reagente 1:** 1 frasco de 15 mL de diluente, 10 vezes concentrado.
- **Reagente 2a:** 1 frasco de 300 µL, AcM anti CD55.
- **Reagente 2b:** 1 frasco de 300 µL, AcM anti CD59.
- **Reagente 3a:** 1 frasco de 600 µL de esfera $\alpha\beta$ pré-calibrada. Esta esfera é caracterizada por α e β , 2 valores de interpretação dos défices em CD55 e 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 3b:** 1 frasco de 300 µL de reagente de saturação.
- **Reagente 4:** 1 frasco de 900 µL de reagente de revelação, Anticorpo policlonal anti IgG de ratinho, ligado a FITC.
- **Reagente 5:** 3 frascos de 3,2 mL de solução de lise dos glóbulos vermelhos.

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.
- Centrifugadora.
- Citómetro.
- Tubos de hemólise para citómetro.
- Tubos de 15 mL.
- Pipetas reguláveis com ponta descartável (20 µL a 1 mL).
- Pipetas graduadas (1, 2, 10 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.
Estabilidade após diluição: 15 dias a 2-8°C.
Preparar o volume necessário para a série a testar.

- **Reagentes 2a, 2b, 3b, 4 e 5:**

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

- **Reagente 3a:**

Após agitação por vortex durante 5 segundos, o reagente está pronto 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 silicone)
- Anticoagulante: EDTA (K₃).

7.2 Tratamento da amostra:

- A amostra deve ser processada nas **8 horas** seguintes à colheita, para limitar a desgranulação dos granulócitos.
- 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 única preparação de esfera $\alpha\beta$ 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:

- Num tubo de 15 mL designado como T0, pipetar **800 µL de reagente 5** (lise).
- Adicionar **7,2 mL** de água destilada conservada à temperatura ambiente.
- Homogeneizar o tubo por meio de um agitador de tipo Vortex durante **5 segundos**.
- Após homogeneização da amostra sanguínea, pipetar **400 µL** de sangue total no 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 por glóbulos vermelhos não lisados, que possa falsear os resultados.

- Homogeneizar o tubo por meio de um agitador de tipo Vortex durante **5 segundos**.
- Incubar **8-12 minutos** à temperatura ambiente.
- Centrifugar **5 minutos a 300 g**.
- Eliminar o sobrenadante.
- Adicionar **2 mL de reagente 1 diluído** (diluente).
- Suspender o fundo celular por meio de um agitador de tipo Vortex.
- Centrifugar **5 minutos a 300 g**.
- Esvaziar o tubo T0 por inversão e aspirar o resto do sobrenadante.
- Verificar visualmente a presença de fundo celular no fundo do tubo.
- Suspender de novo o fundo celular na pipeta, adicionando **150 µL de reagente 1 diluído**.
- Homogeneizar o tubo por meio de um agitador de tipo Vortex durante **2 segundos**.

Observação: uma lise incompleta dos glóbulos vermelhos pode ser observada em certas amostras. Recomenda-se então pré-aquecer a 37°C a água destilada utilizada para diluir a lise.

8.2 Preparação da esfera $\alpha\beta$:

Tomar um tubo de plástico identificado como T1.

- Depois de suspender de novo o reagente 3a por vortex, pipetar **50 μL** do reagente 3a (esfera $\alpha\beta$) no tubo T1 e adicionar **25 μL** de **reagente 3b** (reagente de saturação).
- Homogeneizar o tubo por meio de um agitador de tipo Vortex durante **2 segundos**.

8.3 Determinação imunológica da amostra:

Num suporte, dispor 2 tubos de plástico identificados como T2 e T3.

Em cada um dos tubos T2 e T3:

- Pipetar **50 μL** de suspensão celular retirada do tubo T0.
- No tubo T2, pipetar **25 μL** de **reagente 2a** (AcM anti CD55).
- No tubo T3, pipetar **25 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 3 tubos T1, T2 e T3:

- Distribuir **25 μL** de **reagente 4** (reagente de revelação).
- Homogeneizar os 3 tubos por meio de um agitador de tipo Vortex durante **2 segundos**.
- Incubar **8-12 minutos** à temperatura ambiente.
- Distribuir **3 mL** de **reagente 1 diluído** em cada tubo.

As amostras assim processadas podem ser conservadas a **2-8°C** durante **4 horas**, 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 5000 granulócitos (ou esferas) por tubo.

• Análise da esfera $\alpha\beta$: tubo T1 (Figs. 1).

Criar um citograma FS vs SS.

Desenhar uma janela de análise "A" em volta da população de esferas $\alpha\beta$ (Fig. 1a).

Criar um histograma FL1 LOG.

Limitar este histograma pela janela de análise "A".

Determinar a média de fluorescência (MFI) do histograma da esfera $\alpha\beta$ (Fig. 1b), na totalidade da população (cursor "B").

Para dispor das condições de análise ideais, o pico da esfera $\alpha\beta$ deve ser posicionado, em FL1, na 3ª década. Para isso, regular a tensão do fotomultiplicador FL1.

Fig. 1a: Citograma da esfera $\alpha\beta$

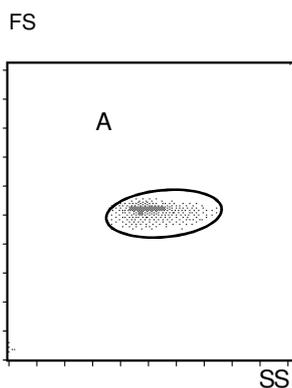
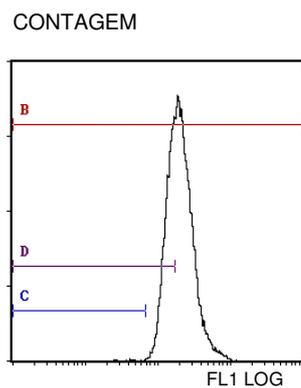


Fig. 1b: Histograma da esfera $\alpha\beta$



• Posicionamento dos cursores de interpretação (Fig. 1b)

No histograma FL1 LOG limitado 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:

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

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

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

• Análise das amostras: tubos T2 (CD55) e T3 (CD59) (Figs. 2)

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

As definições de ganho em varrimento lateral ("side scatter" - SS) devem ser adaptadas para isolar, no citograma FS vs SS, a população granulocitária de interesse (janela de análise "A", Fig. 2a).

A janela de análise A deverá ser preferencialmente elipsoidal e restringir-se à parte densa da nuvem, por forma a evitar a inclusão de células não granulocitárias (por exemplo, monócitos).

No histograma FL1 LOG, limitado pela janela de análise A dos granulócitos:

Tubo T2: determinar a percentagem de células situadas no cursor C

Tubo T3: determinar a percentagem de células situadas no cursor D.

Fig. 2a: Posicionamento da janela A em volta da população de granulócitos

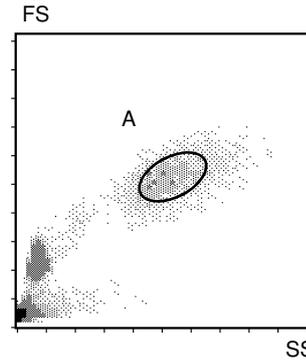
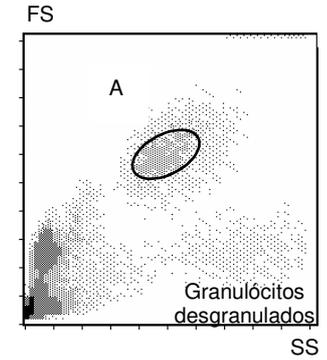


Fig. 2b: Posicionamento da janela A em volta da população de granulócitos não desgranulados



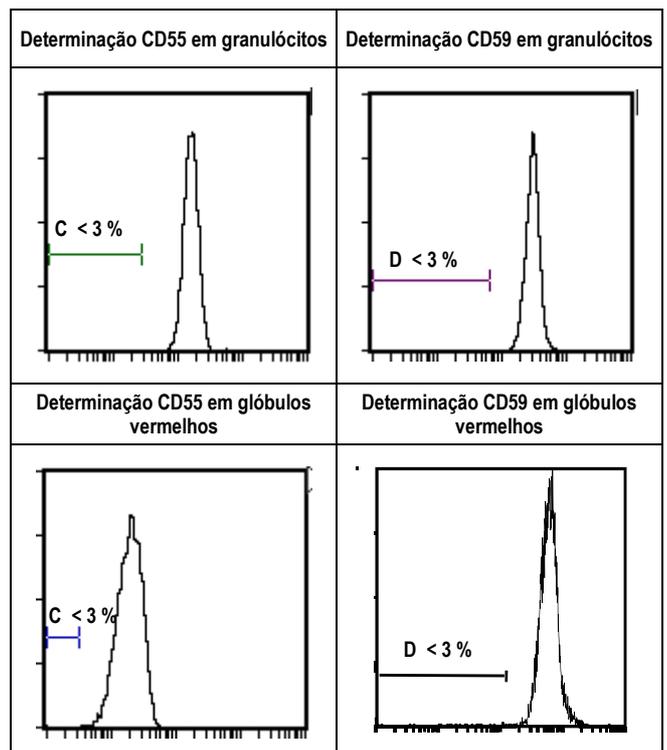
Nota: o envelhecimento da amostra traduz-se no aparecimento de uma subpopulação granulocitária de tamanho inferior (Fig. 2b). É necessário posicionar a janela de análise A sobre os granulócitos nativos não desgranulados.

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.

Segundo 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 granulócitos e glóbulos vermelhos (amostra normal):

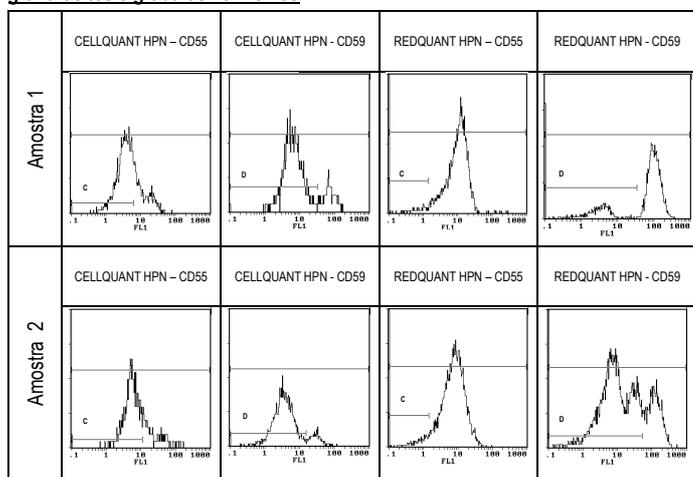


Interpretação do teste:

Nº parâmetros > 3%	CELLQUANT HPN		REDQUANT HPN		Conclusão
	CD5	CD59	CD5	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
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 granulócitos e glóbulos vermelhos:



10 LIMITAÇÕES DO DISPOSITIVO

Uma lise incompleta pode ser observada em certas amostras. Tal pode dar origem a um resultado falsamente positivo no CD59 (> 3% de células deficientes) devido à fixação do anticorpo CD59 aos glóbulos vermelhos residuais.

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 98,8% de células deficientes em CD55.
De 0% a 99,9% 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 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, o CD59 é > 3%	Lise de glóbulos vermelhos não ideal	Pré-aquecer a água destilada a 37°C para diluir a lise
Numa amostra normal, uma determinação correspondente ao ruído de fundo aparece no tubo CD55 e/ou CD59 (> 3% de células deficientes)	Foi esquecido o reagente R2a e/ou R2b	Repetir a manipulação, tendo o cuidado de depositar todos os reagentes
Numa amostra normal, uma determinação correspondente ao ruído de fundo aparece nas esferas e nas células (> 3% de células deficientes)	Foi esquecido o reagente R4	Repetir a manipulação, tendo o cuidado de depositar o reagente
Poucas ou nenhuma esfera αβ foram detectadas no histograma FS vs SS	Re-suspensão incorrecta das esferas αβ	Ter o cuidado de homogeneizar durante um mínimo de 5 segundos, antes da abertura e pipetagem do reagente R3a
Após a análise das esferas, não são detectados granulócitos no histograma FS vs SS	O PMT SS não está devidamente regulado	Aumentar o ganho no SS para otimizar o posicionamento da população granulocitária
A nuvem de granulócitos é heterogénea e o CD55 e/ou o CD59 são > 3% numa amostra normal	A amostra deve ter sido recolhida há mais de 8 horas e os granulócitos estão desgranulados	Posicionar a janela de análise "A" na nuvem de granulócitos não desgranulados. A janela de análise "A" deverá ser, de preferência, elipsoidal e restringir-se à parte densa da nuvem, para evitar a inclusão de células não granulocitárias
Numa amostra normal, mais de 3% de células deficientes CD55 e CD59 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		Código do lote
Fabricante		



BIOCYTEX
140, CHEMIN DE L'ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE
TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71
Versão Outubro 2017