

HeMoStep™ kit

Determinazione della contaminazione da sangue periferico del liquido cerebrospinale

REF

Σ

IMS1510

100 test

CE IVD

1. USO PREVISTO

Il kit HeMoStep è un immunoensayo in vitro per la determinazione quantitativa della contaminazione ematica dei campioni di liquido cerebrospinale (LCR) mediante citometria a flusso.

L'uso previsto del test è quantificare la contaminazione dei campioni di LCR con sangue periferico, contribuendo, in combinazione con altri test quali la citometria a flusso (CMF) e la citologia (CC), alla corretta interpretazione dei risultati derivanti dall'analisi di questo tipo di campioni (LCR) e contribuendo a migliorare la diagnosi della malattia leptomeningea in pazienti con linfomi a cellule B e T e leucemie acute di origine linfoidi e mieloide.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

L'analisi cellulare del liquido cerebrospinale è una procedura clinica importante per la diagnosi, la classificazione e la prognosi di un'ampia varietà di malattie. Il prelievo del campione di CSF viene effettuato mediante una procedura chiamata puntura lombare (PL), che consiste nell'inserimento di un ago nel canale spinale. Durante la procedura, l'ago attraversa diversi strati di tessuto vascolarizzato fino a raggiungere lo spazio subaracnoideo e può introdurre sangue periferico (SP) nella provetta, contaminando il CSF. Inoltre, la puntura può talvolta complicarsi provocando un aumento del sanguinamento, denominato PL traumatico (fino al 20%), che determina una contaminazione rossa visibile del campione di CSF. Questo tipo di puntura è denominato traumatico. Pertanto, la presenza di cellule ematiche e la concentrazione alterata di alcune sostanze a causa della contaminazione ematica nel CSF possono complicare l'analisi e confondere la diagnosi.

L'immunofenotipizzazione mediante CMF multiparametrica combina un'elevata specificità con una buona sensibilità clinica e diversi studi e linee guida raccomandano questa immunofenotipizzazione per una diagnosi efficiente e affidabile del LCR in pazienti con neoplasie ematologiche come linfomi a cellule B e T e leucemie acute di origine linfoidi e mieloide, in cui si sospetta un'infiltrazione tumorale nel LCR2-4. La valutazione della contaminazione del LCR con SP deve essere effettuata in tutti i casi e in particolare nei casi in cui si osserva la presenza di cellule ematiche e quando sono presenti cellule maligne nel sangue periferico. A questo proposito, nonostante il liquido cerebrospinale sia cristallino, è normale che presenti un'alterazione del colore dovuta a un sanguinamento patologico nel sistema nervoso centrale (SNC) o, come già detto, a una puntura traumatica. In questo secondo caso è difficile valutare il grado di contaminazione solo mediante ispezione visiva, poiché la soglia visiva per la percezione del sangue nel liquido cerebrospinale varia da 400 a 6000 globuli rossi (RBC) per mm3, secondo diversi autori1,5-6 e anche una contaminazione da sangue visibilmente non rilevabile può alterare drasticamente il contenuto di LCR.

Alcuni dei metodi più comunemente utilizzati per stimare la contaminazione del liquido cerebrospinale da parte delle CMF si basano sull'immunofenotipizzazione e sulla conta delle cellule contaminanti assolute nel sangue periferico, principalmente globuli rossi e/o neutrofili. Tuttavia, questo tipo di protocolli presenta dei limiti (bassa precisione e scarsa sensibilità) legati alla perdita di cellule durante le fasi di concentrazione/centrifugazione, ma anche alla distruzione delle cellule dovute ai rapidi effetti citotossici in vitro del CSF sui leucociti e, quindi, sui neutrofili (R Dux, 1994).

La valutazione della qualità del campione di liquido cerebrospinale è fondamentale nella diagnosi e nel monitoraggio delle leucemie e dei linfomi e disporre di un metodo che consenta di ovviare agli svantaggi associati alla distruzione cellulare di questo tipo di analisi può essere un fattore determinante per ottenere risultati adeguati.

Questo kit, basato sulla quantificazione dell'emoglobina totale (Hb), marcatore specifico dei globuli rossi, aiuta a interpretare i risultati diagnostici, poiché aggira i problemi derivanti dalla citotossicità del CSF, riduce al minimo l'uso del campione, il che è particolarmente importante nei campioni a bassa concentrazione cellulare2,7, e migliora in modo molto significativo la sensibilità per la determinazione della contaminazione del CSF con SP.

3. FONDAMENTO DEL METODO

Il kit HeMoStep è un immunoassay monoplex (popolazione singola) di tipo sandwich che consente la cattura di un analita solubile (Hb). Il test si basa su microsfere rivestite con un anticorpo di cattura e marcate internamente con fluorescenza in FL3 (685 nm), che presentano un pattern di intensità di fluorescenza discreta con un trasferimento molto limitato a FL1 (519 nm) o FL2 (578 nm), lasciando altri rilevatori disponibili per la determinazione dell'analita. In una prima fase, il campione viene incubato con le microsfere, consentendo all'anticorpo che riveste le microsfere di catturare l'analita presente nel campione. Successivamente, le microsfere vengono lavate per rimuovere il resto del campione e poi incubate con l'anticorpo rivelatore, coniugato fluorescentemente con Ficoeritrina (PE). Dopo un secondo lavaggio e una risospensione, le microsfere possono essere analizzate utilizzando un citometro a flusso. L'intensità della fluorescenza è proporzionale alla quantità di analita presente nel campione. Il test può essere eseguito su qualsiasi citometro a flusso convenzionale ed è destinato all'uso professionale.

4. REAGENTI

a) Contenuto del kit

I reagenti inclusi in un kit sono sufficienti per eseguire 100 determinazioni. Ogni kit HeMoStep contiene:

INCUB	Tampone di incubazione per il kit HeMoStep. Una fiala da 5,5 ml (45 µl/test).
BEADS	Microsfere di cattura rivestite con un anticorpo monoclonale specifico per l'Hb. Le microsfere magnetiche in polistirene (diametro medio di 6 µm) sono fornite in 1 flaconcino alla seguente concentrazione: 2000 microsfere/test (5 µl/test) e in una soluzione acquosa tamponata contenente stabilizzatore proteico e azoturo di sodio allo 0,09% (NaN3) come agente antimicrobico.
WASHBUF 10X	25 ml di tampone di lavaggio (10X). PBS 10% BSA, pH 7,4 – 10X. Contiene il 10% di albumina in 10mM di fosfato di sodio, 150mM di NaCl, pH 7,4, contiene KATHON™ agente antimicrobico. Diluire il contenuto del tampone di prova 10X a 1X (PBS 1% BSA) in PBS, pH 7,4, per l'uso in questo test.
CNTRL+	Controllo positivo. 5 fiale di lisato di globuli rossi liofilizzato. Solubilità in H2O. Ricostituire prima dell'uso.
STD	Standard di concentrazione nota. 1 fiala di lisato di globuli rossi liofilizzato con concentrazioni note di [Hb]. Solubilità in H2O. Ricostituire prima dell'uso. Da utilizzare per generare la curva standard.
CONJ	1,2 ml di anticorpo rivelatore coniugato con fluorescenza (PE) (10 µl/test). L'anticorpo è fornito in 2 fiale (0,6 ml/fiala), concentrazione d'uso e in soluzione acquosa tamponata contenente stabilizzatore proteico e azoturo di sodio allo 0,09% (NaN3) come agente antimicrobico.
	Istruzioni per l'uso.

b) Materiali, reagenti e attrezzature necessari non forniti

- Citometro a flusso dotato almeno di un laser blu, 488 nm, e canali fluorescenti per PE (Ex-Max 496 nm/Em-Max 578 nm) e PerCP (Ex-Max 482 nm/Em-Max 678 nm).
- Micropipette calibrate regolabili che coprono un intervallo di 1-1000 µL e i relativi puntali monouso.
- Puntali per pipette.
- Pipette Pasteur.
- Rastrelliera magnetica; MagneSphere(R) Mag. Sep. Stand 12- hole, 12x75mm (PROMEGA, Ref Z5343).
- 12x75 mm Provette in polistirolo a fondo tondo (provette per citometro).
- 1,5 ml Eppendorf tube.
- Soluzione FACS Lysing (BD Biosciences, n. catalogo 349202), da utilizzare durante il protocollo come diluente del campione e controllo negativo .DILUB CNTRL-[PBS]; pH 7,4 (soluzione salina tamponata con fosfato) 1X, da utilizzare per la diluizione del tampone di lavaggio 10X e nella preparazione del campione.
- Kit di calibrazione (Rif.: IMS1511).
- H2O deionizzata o distillata.
- Timer.
- Guanti monouso.
- Contenitore per rifiuti biologici.

5. CONDIZIONI ADEGUATE DI CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE

Conservare in frigorifero a una temperatura compresa tra +2 e +8 °C. NON CONGELARE. Il kit non aperto è stabile fino alla data di scadenza. Non utilizzare dopo tale data. Una volta aperto, i reagenti sono stabili se conservati a una temperatura compresa tra +2 e +8 °C e protetti dalla contaminazione. Fanno eccezione lo standard e i controlli positivi che, una volta ricostituiti, devono essere utilizzati immediatamente. Se non è possibile utilizzarli immediatamente o se dopo l'uso ne rimane una quantità in eccesso, si raccomanda di smaltirli o, in ultima istanza, di congelarli (-20 °C), dove possono rimanere stabili per alcuni giorni (ad esempio 5 giorni). Non lasciare i reagenti aperti e a una temperatura diversa da quella di conservazione per più tempo di quanto strettamente necessario.

6. RACCOMANDAZIONI E AVVERTENZE

- PER DIAGNOSI IN VITRO. Solo per uso professionale.
- Solo per personale di laboratorio qualificato.
- I componenti del kit contengono KATHON™ o azoturo di sodio (NaN3). I composti devono essere sciolti con acqua corrente prima di essere smaltiti. Si raccomandano queste condizioni per evitare depositi nelle tubature. Scheda di sicurezza (MSDS) disponibile sul sito web www.immunostep.com
- Prima di iniziare l'analisi, leggere attentamente le istruzioni. Eventuali deviazioni dalle procedure raccomandate potrebbero invalidare i risultati delle analisi. Non sostituire o mescolare i reagenti del kit Immunostep con reagenti di altri produttori.
- Prima di acquisire i campioni, è necessario assicurarsi che la configurazione del citometro a flusso e la sua compensazione siano adeguate.
- Tenere i componenti del kit al riparo dalla luce diretta durante il protocollo. Gli anticorpi e le microsfere coniugate con fluorescenza sono sensibili alla luce.
- I campioni devono essere trattati allo stesso modo di quelli che potrebbero trasmettere infezioni. Devono essere disponibili metodi adeguati per la loro manipolazione.
- I reagenti non devono essere utilizzati se la confezione presenta evidenti segni di deterioramento.
- Utilizzare dispositivi di protezione individuale per la manipolazione dei campioni. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver manipolato i campioni. Tutte le procedure devono essere eseguite in conformità con le norme di sicurezza approvate.
- Se i controlli positivi e negativi non vengono montati in ogni serie di campioni, è importante ricordare che dovrebbero essere montati periodicamente per garantire il corretto funzionamento del kit una volta aperto.

! I reagenti contenuti in questo kit includono sostanze di origine umana. Sebbene i materiali di origine umana siano stati testati e risultino negativi all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), all'epatite C e al virus dell'immunodeficienza umana, tutti i materiali e i campioni dei pazienti devono essere manipolati e smaltiti come potenzialmente infettivi utilizzando procedure di laboratorio sicure.

! Analizzare il colore del liquido cerebrospinale. Il liquido cerebrospinale normale è trasparente come il cristallo, ma in seguito a un trauma apparirà di colore rosa, con un contenuto superiore a 400 globuli rossi/μl. In questo caso potrebbe essere necessario effettuare una diluizione per l'analisi, secondo quanto indicato al punto 7.1 della presente scheda tecnica.

7. PRELIEVO DI CAMPIONI

Per le analisi CMF multiparametriche, prelevare ≥2 ml di liquido cerebrospinale mediante PL. Conservare il campione in frigorifero a una temperatura compresa tra +2 e +8 °C. Il campione deve essere trattato entro 1 ora dalla PL, altrimenti è necessario stabilizzarlo a causa degli effetti citotossici del liquido cerebrospinale sui leucociti.

Nel caso specifico in cui sia necessario inviare il campione tra laboratori o a un laboratorio centrale, è necessario stabilizzare il campione direttamente al momento del prelievo. Esistono diverse soluzioni commerciali disponibili sul mercato che conservano le cellule per alcuni giorni (ad esempio 48 ore). All'arrivo del campione con stabilizzante al laboratorio di analisi, misurare e annotare il volume di CSF ricevuto. Non dimenticare di sottrarre la quantità di soluzione stabilizzante utilizzata.

7.1 PPPreparazione dei campioni

Quando il campione arriva al laboratorio di analisi, con o senza stabilizzante, misurare e annotare il volume di CSF ricevuto. Non dimenticare di sottrarre la quantità di soluzione stabilizzante utilizzata. Successivamente, aggiungere 2 ml di tampone salino filtrato/sterile ([PBS]; pH 7,4) al campione e centrifugare per 5 minuti a 540 g. Rimuovere il surnatante con molta attenzione, evitando la perdita di cellule, e risospendere il pellet cellulare in 300 μl di [PBS]; pH 7,4 filtrato/sterile. Per la colorazione del campione e la combinazione di anticorpi da utilizzare, si raccomanda di seguire le raccomandazioni EuroFlow8-10. Dopo la colorazione, aggiungere 2 ml di soluzione FACS lysing (BD Biosciences) e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (RT). Dopo l'incubazione, centrifugare i campioni per 5 minuti a 540 g e raccogliere in una provetta separata il supernatante di lisi, mentre le cellule rimaste nella provetta centrifugata vengono risospese in 50 μl di [PBS]; pH 7,4 filtrato/sterile, per continuare con il protocollo di acquisizione al citometro, secondo le raccomandazioni EuroFlow⁸⁻¹⁰.

Il surnatante di lisi è il tipo di campione analizzabile con questo kit, poiché contiene l'analita (Hb) che consente di stimare il grado di contaminazione del liquido cerebrospinale con SP.

Il surnatante di lisi può essere utilizzato immediatamente o congelato (-20 °C) fino a 6 mesi, per un successivo utilizzo con il kit.

Al momento dell'assemblaggio del kit, si raccomanda di effettuare un'analisi visiva del colore del campione, al fine di determinare se sarà necessario diluirlo utilizzando la soluzione FACS lysing. A tal fine, è allegata una guida orientativa che consente, in base al colore, di stimare la diluizione del campione, evitando l'"effetto gancio" che si verifica nei campioni con un'alta concentrazione dell'analita e facilitando la caduta della fluorescenza nell'intervallo di interpolazione della curva di calibrazione (Fig. 1).

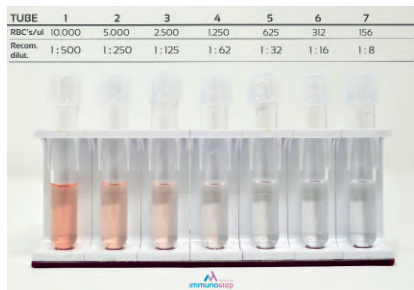


Figura. 1: Guida orientativa a colori corrispondente al campione di supernatante di lisi con diverse concentrazioni di globuli rossi e alla diluizione suggerita da utilizzare.

Una volta stabilita la diluizione da utilizzare, diluire i campioni nella soluzione FACS lysing e miscelare con un agitatore vortex. I campioni diluiti devono essere analizzati entro le 2 ore successive.

8. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Lasciare i reagenti a temperatura ambiente (tra +18 °C e +24 °C) per 30 minuti.

Il tampone di lavaggio incluso nel kit è un concentrato 10X. Se durante la conservazione si osserva cristallizzazione nel tampone concentrato, riscaldare a 37 °C e agitare bene prima di procedere alla diluizione. Per eseguire la diluizione, prelevare dalla bottiglia del concentrato la quantità necessaria per i test e diluire 1:10 in PBS, pH 7,4. Ricostituire lo standard e il controllo positivo rispettivamente in 200 e 100 μl di H₂O.

Etichettare tante provette di polistirolo a fondo tondo da 12x75 mm (provette per citometria) quanti sono i campioni, i controlli, le microsfere di calibrazione e le diluizioni della curva di calibrazione da analizzare. Si raccomanda di effettuare repliche di ciascun campione, standard e controllo.

9. PROCEDIMENTO DI PROVA

Il protocollo può essere eseguito in una provetta da citometria (12x75 mm) (ALLEGATO I).

1 Preparazione delle microsfere di cattura con il campione	Riesprimere la fiala di microsfere di cattura mediante un vortex per circa 20 secondi. Aggiungere alle provette etichettate come campione, controlli e curva standard, 5 μl delle microsfere di cattura. Aggiungere quindi 45 μl del tampone di incubazione HeMoStep.
2 Preparazione dei controlli	Il controllo positivo (+) viene fornito liofilizzato e deve essere ricostituito immediatamente prima dell'uso. Aprire la fiala del controllo positivo (+) liofilizzato e ricostituirlo con 100 μl di H ₂ O e mescolare con la pipetta, non agitare con vortex, quindi lasciare equilibrare per 15 minuti a temperatura ambiente. Una volta equilibrato, aggiungere 50 μl rispettivamente del controllo positivo (+) e del controllo negativo (FACS lysing) a ciascuna delle provette precedentemente identificate come tali. Agitare con un vortex per circa 20 secondi. Continuare con il passaggio n. 5.
3 Preparazione delle microsfere calibrazione	Questo passaggio viene eseguito con il kit di calibrazione (Rif.: IMS1511). Ricostituire la provetta delle perle di calibrazione aggiungendo 50 μl di caseina per circa 2 minuti. La procedura prosegue al passaggio 7 (incubazione del coniugato).
4 Preparazione della curva patronale	Lo standard è fornito in formato liofilizzato e deve essere ricostituito immediatamente prima dell'uso. Il kit contiene una quantità di standard sufficiente per realizzare due curve standard. Per ulteriori informazioni, consultare il punto 10 del presente documento. Continuare con il passaggio n. 5.
5 Incubazione del campione	Incubare le provette (campione, controlli, microsfere di calibrazione e provette corrispondenti alla curva standard) per 30 minuti a temperatura ambiente, al buio e sotto agitazione.
6 Lavaggio	Dopo l'incubazione, lavare una volta il campione (Hb legato alle microsfere) utilizzando 1 ml (provetta) di tampone di lavaggio 1X (vedere punto 8 - Preparazione dei reagenti) per ogni lavaggio. Lasciare il tampone di lavaggio in ogni provetta per 30-60 secondi per ogni lavaggio. Successivamente, raccogliere le microsfere magnetiche posizionando le provette su una griglia magnetica e incubando per 5 minuti. La raccolta delle microsfere può essere effettuata anche mediante centrifugazione a 2500xg per 5 minuti. Rimuovere il surnatante dalle provette mediante decantazione manuale o mediante aspirazione nel caso in cui sia stata utilizzata la centrifugazione. Prestare attenzione a non alterare le microsfere e assicurarsi di lasciare un volume minimo di 50 μl e massimo di 85 μl di surnatante nella provetta.
7 Incubación del conjugado	Aggiungere 10 μl dell'anticorpo rilevatore coniugato con fluorescenza nelle provette del citometro. Agitare con vortex per circa 20 secondi e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente, al buio e sotto agitazione.

8 Lavaggio	Dopo l'incubazione, lavare una volta come descritto sopra (passaggio 6).
9 Misurazione	Risospendere il campione in 200 μl di PBS e acquisirlo in un citometro a flusso. Può essere conservato al riparo dalla luce per un massimo di 30 minuti a 2-8 °C, fino al momento dell'acquisizione nel citometro. Per ulteriori informazioni sulla strategia di analisi e acquisizione, consultare il punto 11 del presente documento.

10. PREPARAZIONE DELLA CURVA MODELLO

A partire dallo standard di concentrazione noto incluso nel kit, preparare una diluizione seriale (1:2) di 13 punti (Fig. 2), utilizzando come soluzione il FACS lysing.

1 Ricostituzione del liofilizzato	Aprire la fiala dello standard liofilizzato e ricostituirlo con 200 μl di H ₂ O, quindi mescolare con la pipetta senza agitare con il vortex e lasciare equilibrare per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine, trasferire lo standard ricostituito in una provetta Eppendorf da 1,5 ml. Questo standard è sufficiente per generare due curve standard in tempi diversi o due repliche in parallelo.
2 Effettuare diluizioni in serie	Etichettare 13 provette Eppendorf da 1,5 ml e ordinarle nel modo seguente: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 e 1:4096. Trasferire lo standard ricostituito nella provetta Eppendorf da 1,5 ml, etichettata come 1:1, e pipettare 100 μl di soluzione FACS lysing in ciascuna delle altre provette etichettate (1:2 – 1:4096). Quindi, eseguire diluizioni seriali, trasferendo 100 μl dalla provetta standard superiore (1:1) alla provetta di diluizione 1:2 e mescolare bene utilizzando la pipetta. Continuare a effettuare le diluizioni seriali trasferendo 100 μl dalla provetta 1:2 alla provetta 1:4 e così via fino alla provetta 1:4096. Mescolare bene utilizzando la pipetta, non agitare con il vortex.
3 Trasferire nei tubi del citometro	Una volta effettuate le diluizioni seriali, trasferire 50 μl di ciascuna delle diluizioni nelle provette da 12x75 mm (provetta per citometro), precedentemente etichettate (punto 8 - preparazione dei reagenti) e contenenti già 50 μl di microsfere di cattura. Ricordare che è consigliabile eseguire due repliche della curva standard. Preparare una provetta da 12x75 mm contenente solo soluzione FACS lysing che corrisponderà alla concentrazione 0 ng/ml di legame non specifico (NSB) e al controllo negativo. Continuare con il passaggio n. 5 - "incubazione del campione" della procedura di analisi, punto 9 del presente documento.

Le concentrazioni (ng/ml) dell'analita (Hb) per ciascuna diluizione standard, nonché uno schema della diluizione seriale (1:2) dello standard incluso nel kit per la costruzione della curva standard sono riportati nell'ALLEGATO II.

Grazie all'uso delle microsfere di calibrazione non sarà necessario generare una curva standard ogni giorno di prova. Sarà necessario generare una nuova curva standard solo nei seguenti casi:

- Quando si utilizza un kit di reagenti di un nuovo lotto.
- Quando sono state modificate le impostazioni del flussimetro.

Per ulteriori informazioni, consultare il punto 12 del presente documento.

11. ACQUISIZIONE E STRATEGIA DI ANALISI AUTOMATICA DI PROVA

I file FCS generati da questo test possono essere analizzati automaticamente con il software FLOWSTEP. Il software consente la costruzione della curva di calibrazione e l'interpolazione dei file FCS corrispondenti ai campioni, calcolando così i livelli di contaminazione e generando un rapporto dettagliato dei risultati. Inoltre, FLOWSTEP esegue i controlli di qualità necessari per garantire la calibrazione e la precisione dell'adattamento della curva.

L'applicazione è progettata per essere intuitiva e accessibile anche agli utenti meno esperti. Se utilizzata insieme al kit HeMoStep, offre una soluzione completa per la quantificazione della contaminazione nel liquido cerebrospinale (CSF). L'analisi dei risultati può essere effettuata anche manualmente, come illustrato nei paragrafi seguenti della presente scheda tecnica.



12. ACQUISIZIONE E STRATEGIA DI ANALISI MANUALE DEL TEST CON IL CITOMETRO

Una strategia adeguata di selezione della popolazione di microsfere deve consentire l'eliminazione dei doppioni e dei residui di sporco, contribuendo alla corretta identificazione della popolazione di microsfere.

12.1. Strategia di analisi dei campioni, controlli e curva standard

Si raccomanda una prima selezione della popolazione di microsfere nel diagramma FSC-H/ FSC-A per eliminare i doppioni (A), seguita da una selezione della popolazione di microsfere nel diagramma a punti SSC-A/FSC-A per rimuovere i residui di sporco e ridurre il marcamento di fondo (B), consentendo la corretta identificazione della popolazione di microsfere in un diagramma a punti per uno qualsiasi dei seguenti canali PerCP / APC, PerCP-Cy5 / APC o PerCP-Cy5.5 / APC (C).

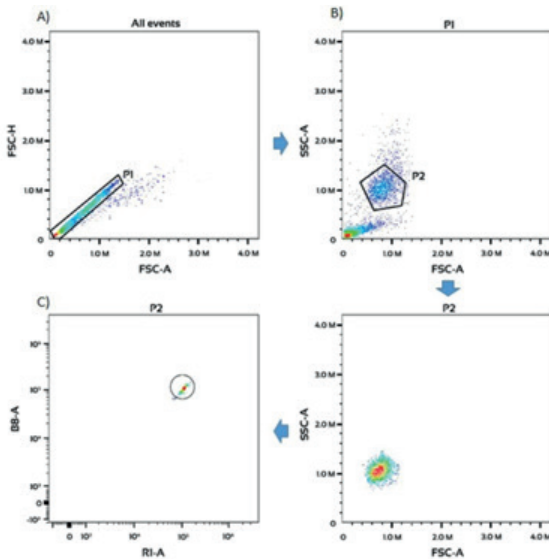


Figura 2: Strategia di analisi per la selezione della popolazione di microsfere nei diagrammi a punti FSC-H/FSC-A (A); SSC/FSC-A (B) e PerCP/APC (C).

13. ANALISI DEI RISULTATI

13.1 Generazione della curva campione

Il test quantitativo utilizza una funzione logistica a quattro parametri (4PL) per convertire il segnale IMF in concentrazioni. Il primo passo consiste nel generare la curva standard utilizzando un software in grado di generare una curva standard la cui regolazione corrisponda a questo tipo di regressione (Fig. 4).

Un'alternativa è quella di costruire una curva standard tracciando l'IMF per ogni standard sull'asse (y) lineare rispetto alla concentrazione su un asse (x) logaritmico ($X=\log(X)$) e disegnare la curva di migliore adattamento attraverso i punti nel grafico. Non includere l'NSB nella curva standard.

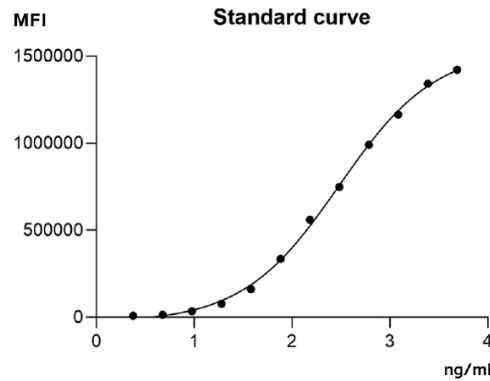


Figura 3: Curva modello standard, solo a titolo orientativo. È necessario costruire una curva standard per ogni lotto di kit utilizzato.

13.2 Calibrazione della curva standard

Il modello dell'equazione di una funzione logistica 4PL è il seguente:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

(x) = la variabile indipendente e (y) = la variabile dipendente.

I 4 parametri stimati sono i seguenti:

(a) = il valore minimo ottenibile (ovvero ciò che accade alla concentrazione 0) (d) = il valore massimo ottenibile (ovvero ciò che accade a una concentrazione infinita) (c) = il punto di inflessione (ovvero il punto della curva a forma di S a metà strada tra a e d).

(b) = pendenza di Hill della curva, che è correlata alla pendenza della curva nel punto (c). (Questi parametri vengono calcolati dal software che stiamo utilizzando).

E descrivono una curva standard a forma di sigmoide come mostrato di seguito (Fig. 5):

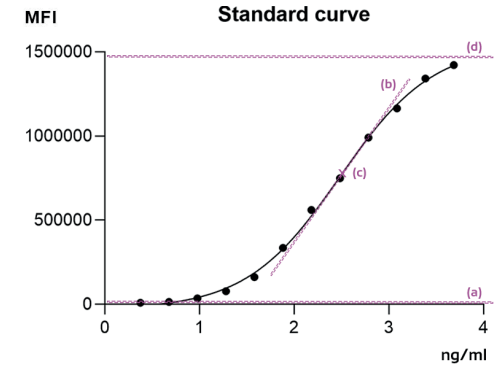


Figura 4: Curva sigmoidea corrispondente all'equazione del modello di regressione logistica a quattro parametri (4PL).

Mentre l'equazione riorganizzata da risolvere (x) è:

$$x = c \left(\frac{a - d}{y - d} - 1 \right)^{\frac{1}{b}}$$

I parametri (b) e (c) definiscono la forma della curva, mentre i parametri (a) e (d) definiscono la posizione della curva e le unità della (y). Se il citometro a flusso è correttamente mantenuto e calibrato, la forma della curva standard è stabile ed è quindi possibile calibrare questa funzione non lineare di 4PL con solo due calibratori e le informazioni relative ai parametri della forma della curva (b) e (c). Le microsfere di calibrazione, specifiche per ogni lotto di kit, sono due popolazioni di microsfere che corrispondono ai parametri (a) e (d) della curva. Queste sfere devono essere acquistate in ogni serie di test, il che consente di verificare che i loro valori IMF rientrino in un intervallo di confidenza (IC) del 95%, consentendo l'utilizzo della curva standard senza necessità di calibrazione, oppure, se sono al di fuori di tale IC 95%, consentiranno di regolare la posizione della curva, senza necessità di generare una curva standard per ogni test. Per ulteriori informazioni, consultare il punto 10 del presente documento.

La curva può essere utilizzata solo per calcolare le concentrazioni per i segnali IMF compresi tra (a) e (d). I campioni al di fuori dell'intervallo determinato da (a) e (d) non possono essere calcolati.

13.3 Analisi della bontà dell'adattamento della curva standard

Per analizzare quanto bene il set di dati si adatti alla curva standard generata, oltre a valutare il valore R2, si raccomanda di eseguire il calcolo a ritroso dello standard e del recupero del controllo positivo, poiché anche se il valore di R2 è molto alto (>0,99), la precisione dell'adattamento determinata dal recupero degli standard può indicare il contrario.

13.3.1 Ricalcolo dello standard

Si tratta di calcolare le concentrazioni di ciascuna delle diluizioni dello standard che danno origine alla curva standard dopo che la regressione è stata completata e quindi confrontarle con il valore di concentrazione reale utilizzando la formula:

$$[\text{obs}] / ([\text{exp}]) \times 100$$

[obs] = concentrazione osservata

[exp] = concentrazione prevista

Questo metodo fornisce informazioni sull'errore relativo nel calcolo dei campioni, essendo auspicabile che ogni standard rientri tra il 70 e il 130% del valore reale, anche se è possibile utilizzare intervalli più ristretti se si desidera una maggiore precisione. In questo modo, i risultati dei campioni al di fuori di questo intervallo potrebbero non essere accurati.

13.3.2 Recupero del controllo positivo

Questo metodo incorpora variabili nella preparazione del test, così come l'analisi di regressione, consentendo di valutare l'accuratezza complessiva del test. A tal fine, si utilizzerà il controllo positivo con concentrazione nota dell'analita e lo si analizzerà per determinare la vicinanza tra il valore di concentrazione calcolato e il valore reale (CoA). Il risultato viene valutato allo stesso modo del recupero degli standard, utilizzando la formula: $[\text{obs}]/([\text{exp}]) \times 100$. Un valore di recupero compreso tra l'80 e il 120% è considerato accettabile.

13.4 Calcolo della concentrazione dell'analita nei campioni

Calcolare la concentrazione logaritmica dell'Hb interpolando i valori IMF dei campioni sulla curva standard. Successivamente, calcolare l'antilogaritmo ($X = 10^X$) del valore risultante dall'interpolazione per ottenere il valore di concentrazione dell'[Hb] (Fig. 6). Se i campioni sono stati diluiti, la concentrazione ottenuta dall'interpolazione con la curva standard e la sua trasformazione antilogaritmica devono essere moltiplicate per il fattore di diluizione.

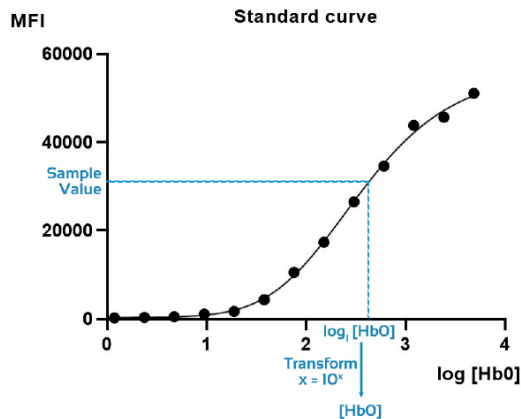


Figura. 5: Esempio di interpolazione del risultato dell'IMF corrispondente a un campione sulla curva standard e calcolo della concentrazione di [Hb] nel campione.

13.5 Interpretazione e valutazione dei risultati

La contaminazione del liquido cerebrospinale (LCR) con sangue periferico (SP), dovuta a una puntura lombare (PL) traumatica, viene tradizionalmente espressa come numero di eritrociti per microlitro [RBC/ μL]. Per un'interpretazione più omogenea e comparabile tra i laboratori, si raccomanda di esprimere il grado di contaminazione nelle stesse unità. A partire dalla concentrazione di emoglobina [Hb] determinata nel surnatante dopo la lisi cellulare (vedi punto 13.4), e utilizzando il volume di CSF registrato (punto 7.1) insieme ai valori di emoglobina (g/dL) e al numero di eritrociti (RBC/ $10^6/\mu\text{L}$) ottenuti dall'emogramma del paziente o, in mancanza di questo, dal CoA, è possibile calcolare la concentrazione equivalente di eritrociti [RBC/ μL] presenti nel CSF.

La procedura di calcolo e le formule necessarie sono descritte nell'Allegato III (Calcolo della contaminazione da sangue periferico). A partire dal fattore di diluizione della SP nel CSF, anch'esso descritto nell'Allegato III, è possibile stimare il numero di leucociti [WBC] presenti nel campione di CSF attribuibili alla contaminazione ematica. Queste informazioni consentono di correggere o interpretare in modo più accurato i conteggi cellulari ottenuti mediante citometria a flusso o altri metodi di analisi cellulare.

I file FCS generati dal test possono essere analizzati automaticamente con il software FLOWSTEP, che costruisce la curva di calibrazione, interpola i risultati dell'intensità media di fluorescenza (IMF) dei campioni e calcola la concentrazione di emoglobina corrispondente. Sulla base di questi dati, il software stima i livelli di contaminazione espressi in [RBC/ μL] e [WBC/ μL], genera un rapporto dettagliato dei risultati ed esegue i controlli di qualità necessari per verificare la calibrazione e la precisione dell'adattamento della curva. L'ambiente FLOWSTEP è progettato per essere intuitivo e accessibile, in modo che, insieme al kit HeMoStep™, fornisca una soluzione completa per la quantificazione e la valutazione della contaminazione ematica nel LCR. In alternativa, l'analisi dei risultati può essere eseguita manualmente seguendo le istruzioni incluse in questa scheda tecnica.

Conoscendo il numero stimato di leucociti attribuibili alla contaminazione ematica, è possibile stabilire la relazione tra questi e il totale delle cellule patologiche rilevate nel CSF. Questo dato, solitamente ottenuto mediante immunofenotipizzazione in parallelo, consente di valutare la possibile infiltrazione cellulare nel sistema nervoso centrale e di distinguere tra una contaminazione ematica significativa e una reale infiltrazione tumorale. Se la contaminazione è rilevante e si dispone della percentuale di cellule patologiche circolanti nel sangue periferico, è possibile determinare se l'infiltrazione osservata nel LCR corrisponde a un falso positivo attribuibile a tale contaminazione o a una vera infiltrazione tumorale. In quest'ultimo caso, è possibile correggere il conteggio sottraendo le cellule patologiche attribuibili alla contaminazione, ottenendo così una stima più precisa del carico tumorale nel LCR.

Per ulteriori informazioni su questa procedura, consultare l'Allegato V (Correzione del conteggio cellulare e interpretazione clinica). Il sistema HeMoStep™ determina quantitativamente la concentrazione di emoglobina nel CSF per valutare la contaminazione preanalitica da sangue periferico. Le sue prestazioni analitiche sono state verificate in conformità alle linee guida CLSI EP05, EP06 ed EP17, stabilendo un LoQ di 3,2 ng/mL, equivalente a circa 100 eritrociti per mL di CSF. Il software interpretativo integra la concentrazione di emoglobina con i dati ematologici del paziente per stimare gli equivalenti di eritrociti e leucociti provenienti dal sangue periferico. L'algoritmo di classificazione ("non contaminato", "limite", "contaminato") è stato convalidato sia matematicamente che clinicamente, in conformità con le linee guida internazionali sulla citologia del liquido cerebrospinale, che stabiliscono ≤ 5 leucociti come limite superiore dell'intervallo fisiologico.

13.6 Valori attesi

Lo studio è stato condotto su 105 campioni di CSF, che non presentavano contaminazione all'esame visivo.

Il campione analizzato era il surnatante di lisi risultante dal trattamento del campione e sono stati ottenuti i seguenti risultati:

	Tutti i campioni			Campioni PL traumatici		
[Hb -	Mean	95th percentile	n	Mean	95th percentile	n
ng/ml]	1201	34,47 - 2368	105	1845	288 - 3402	34
RBC/ μL *	38	9 - 67	82	101	21 - 182	29

*Calcolato in base al punto 13.4 del presente documento.

Ogni laboratorio deve ricercare i valori attesi per la propria popolazione di campioni e, se necessario, determinare i propri intervalli di riferimento.

14. CARATTERISTICHE DEL RENDIMENTO

14.1 Capacità di rilevamento

Lo studio del limite di rilevabilità, talvolta denominato anche sensibilità analitica, è stato condotto in conformità alla guida EP17-A2 (CLSI). Valutazione della capacità di rilevabilità per uso clinico. Il risultato di questo studio è espresso in [Hb ng/ml].

- Il limite di rilevabilità del test (LoD) o concentrazione minima rilevabile dell'analita dal test è [3,15 ng/ml] di Hb.
- Il limite di quantificazione del test (LoQ) o concentrazione minima dell'analita che può essere quantificata con precisione è [3,2 ng/ml] di Hb.

14.2 Precisione

Per lo studio della precisione intra-laboratorio sono stati selezionati quattro (4) campioni (negativo, LoD, controllo positivo e campione positivo) seguendo le raccomandazioni del CLSI (EP05-A3). Valutazione della precisione della misurazione quantitativa.

È stato quindi selezionato un disegno sperimentale $20 \times 2 \times 2$, consistente in uno studio della durata minima di 20 giorni, con due serie per ogni giorno in cui viene eseguita la prova e con due repliche per campione analizzato in ogni serie.

La prova è stata eseguita su un unico strumento. I risultati sono stati i seguenti:

		Ripetibilità	Interserie	Interdia	Intralaboratorio
Pos	n	3,74			
	Valor medio (ng/ml)	92,03			
	SD (ng/ml)	3,74	13,75	3,74	13,75
	CV (%)	4,06%	14,95%	4,06%	14,95%
Control +	n	78			
	Valor medio (ng/ml)	10,85			
	SD (ng/ml)	0,35	1,80	0,35	1,80
	CV (%)	3,28%	16,85%	3,28%	16,85%
LoD	n	78			
	Valor medio (ng/ml)	2,90			
	SD (ng/ml)	0,03	0,11	0,03	0,11
	CV (%)	0,87%	3,86%	0,87%	3,86%
Neg	n	80			
	Valor medio (ng/ml)	2,41			
	SD (ng/ml)	0,02	0,03	0,02	0,03
	CV (%)	0,74%	1,14%	0,79%	1,11%

14.3 Riproducibilità

Allo stesso modo, è stato condotto uno studio di riproducibilità, con un disegno sperimentale $5 \times 2 \times 2$, consistente in uno studio della durata di 5 giorni, in due laboratori e due repliche di ciascun campione. Lo studio è stato condotto per verificare se esistono differenze tra le apparecchiature, con i seguenti risultati:

		Entre lab
Positivo	n	20
	Media	131,9645973
	SD	37,6628082
	CV	23,19%
LoD	n	14
	Media	2,756914985
	SD	1,513798652
	CV	29,02%

14.4 Confronto tra metodi

È stato effettuato un confronto tra i metodi di conteggio assoluto dei granulociti neutrofili mediante CMF (x) e HemoStep kit (y), su un totale di 29 campioni classificati come PL traumatici in base alla colorazione rossastra del liquido cerebrospinale e/o all'osservazione di un pellet cellulare di colore rosso dopo la centrifugazione del campione, dimostrando una buona correlazione lineare ($r = 0,9081$; $p < 0,0001$) diretta tra le variabili numero di granulociti e numero di RBC calcolate con ciascuno dei metodi.

14.5 Specificità analitica

Le emorragie patologiche nel SNC provocano lo stravasamento di globuli rossi che vengono lisati nel liquido cerebrospinale, con conseguente catabolismo dell'emoglobina in bilirubina. Quest'ultimo processo avviene circa 12 ore dopo l'emorragia e persiste per due settimane. Per questo motivo è stata analizzata la possibile reattività crociata che livelli elevati di bilirubina potrebbero avere sui risultati del test. A tal fine sono stati selezionati campioni di CSF contaminati artificialmente con SP e arricchiti con 0,4 mg/ml di bilirubina. Successivamente, i campioni sono stati elaborati e analizzati seguendo le istruzioni del kit e in nessun caso sono state osservate differenze significative tra i campioni arricchiti con bilirubina e quelli non arricchiti.

D'altra parte, sono state analizzate anche le possibili interferenze delle soluzioni stabilizzanti del LCR disponibili in commercio, quali: TransFix (Cytomark) e Streck Cell Preservative (Streck Inc). A tal fine sono stati selezionati campioni di LCR e contaminati artificialmente con SP, per poi diluirli con TransFix in rapporto 1:10 e 1:20 e Streck Cell Preservative utilizzando una diluizione 1:10; infine, sono stati lasciati stabilizzare durante la notte (O/N) a 4 °C. Tutti i casi sono stati confrontati con il LCR contaminato senza interferenti né stabilizzanti. I campioni sono stati quindi analizzati seguendo le istruzioni del kit e in nessun caso sono state osservate differenze significative tra i campioni.

15. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- I risultati devono essere valutati in combinazione con altre procedure diagnostiche.
- Risultati al di fuori dell'intervallo determinato dalla curva standard. Per ulteriori informazioni, consultare il punto 12.2 del presente documento.
- I risultati del test dipendono dalla corretta esecuzione delle procedure di prelievo e trattamento del campione.
- Nella trasformazione del risultato da [Hb – ng/ml] del surnatante di lisi a [[RBC/μl] nel LCR, si presume che il volume di FACS lysing utilizzato sia di 2000 μl. Per ulteriori informazioni, consultare l'ALLEGATO III.

16. BIBLIOGRAFIA

1. Kaushal H Shah- et al (2003). Incidence of traumatic lumbar puncture. Acad Emerg Med. Feb;10(2):151-4.
2. Sancho, J.-M. et al. (2010) 'Clinical significance of occult cerebrospinal fluid involvement assessed by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma patients at high risk of central nervous system disease in the Rituximab Era', European Journal of Haematology, 85(4), pp. 321–328.
3. Kraan, J. et al. (2008) 'Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid', Current Protocols in Cytometry, 45(1).
4. Subirá, D. et al. (2002) 'Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice', American Journal of Clinical Pathology, 117(6), pp. 952–958.
5. Patten, B.M. (1968) 'How much blood makes the cerebrospinal fluid bloody?', JAMA: The Journal of the American Medical Association, 206(2), p. 378.
6. Chow, G. and Schmidley, J.W. (1984) 'Lysis of erythrocytes and leukocytes in traumatic lumbar punctures', Archives of Neurology, 41(10), pp. 1084–1085.
7. Dux, R. et al. (1994) 'A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid', Journal of the Neurological Sciences, 121(1), pp. 74–78.
8. Quijano, S. et al. (2009) 'Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell Non-Hodgkin's lymphoma: Improved sensitivity of flow cytometry', Journal of Clinical Oncology, 27(9), pp. 1462–1469.
9. Van Dongen, J.J. et al. (2012) 'EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes', Leukemia, 26(9), pp. 1908–1975.
10. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Cerebrospinal fluid sample (CSF) preparation and small tube (SST) staining; EuroFlow, 2024.
11. CLSI. Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guideline, H56-A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

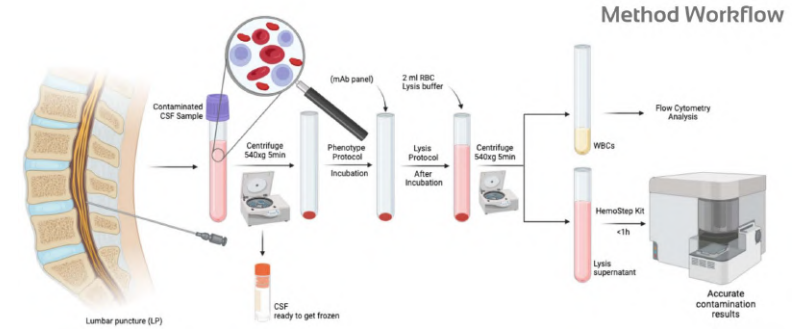
17. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI

	Il contenuto è sufficiente per <n> analisi.
REF	Riferimento prodotto
	Etichettatura CE
IVD	Mezzo diagnostico in vitro
	Produttore
	Data di scadenza
LOT	Numero di lotto
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Conservazione da x °C a y °C
	Contenuto di ogni test
	Prestare attenzione
	Pericoli biologici
BEADS	Microsfere di cattura
WASHBUF 10X	Buffer di lavaggio 10
CNTRL+	Controllo positivo
CAL	Microsfere di calibrazione
STD	Standard di concentrazione nota
CONJ IgG	Anticorpo rilevatore coniugato fluorescentemente

18. DATI DEL PRODUTTORE

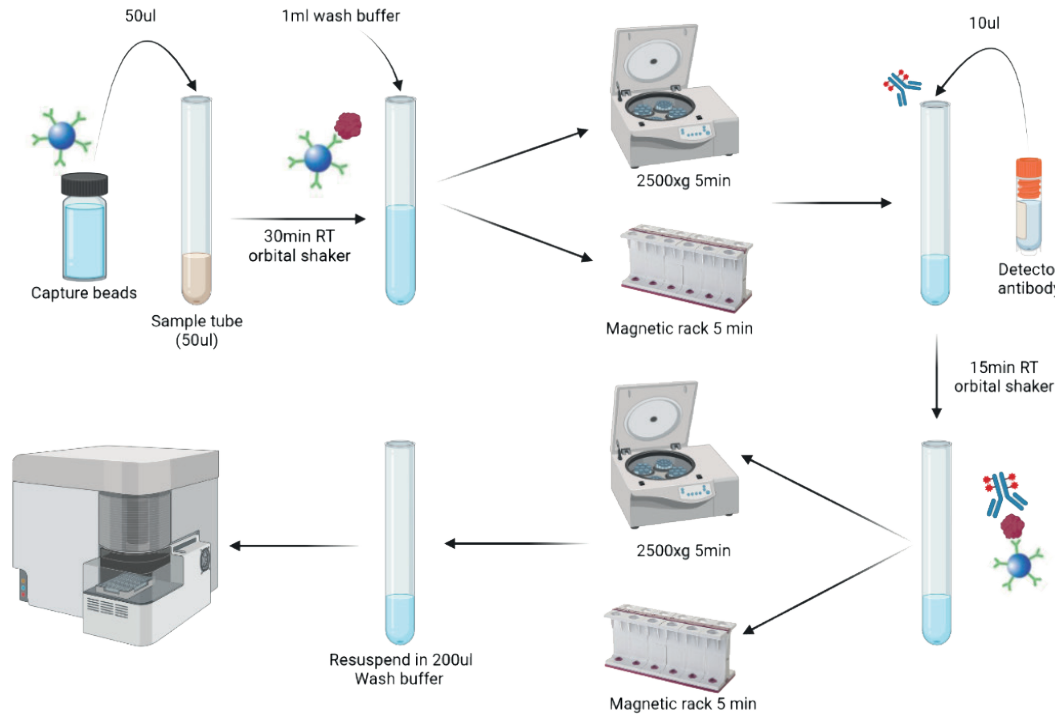
IMMUNOSTEP S.L.
 Dirección: Avda. Universidad de Coimbra, s/n
 Cancer Research Center (C.I.C)
 Campus de Unamuno
 37007 Salamanca (Spain)
 Telf./fax: (+34) 923 294 827
 E-mail: info@immunostep.com
www.immunostep.com

ALLEGATO I. LCR Preparazione dei campioni

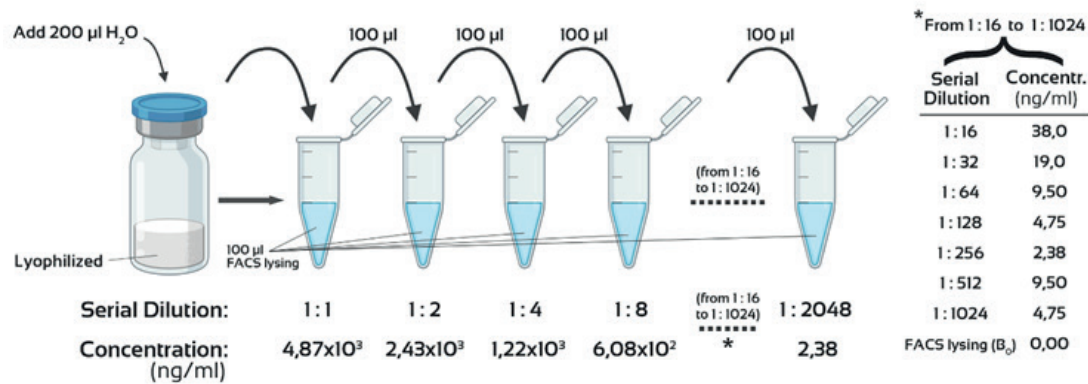


Nota: La preparazione del campione di CSF è conforme alla procedura operativa standard (SOP) di Euroflow.

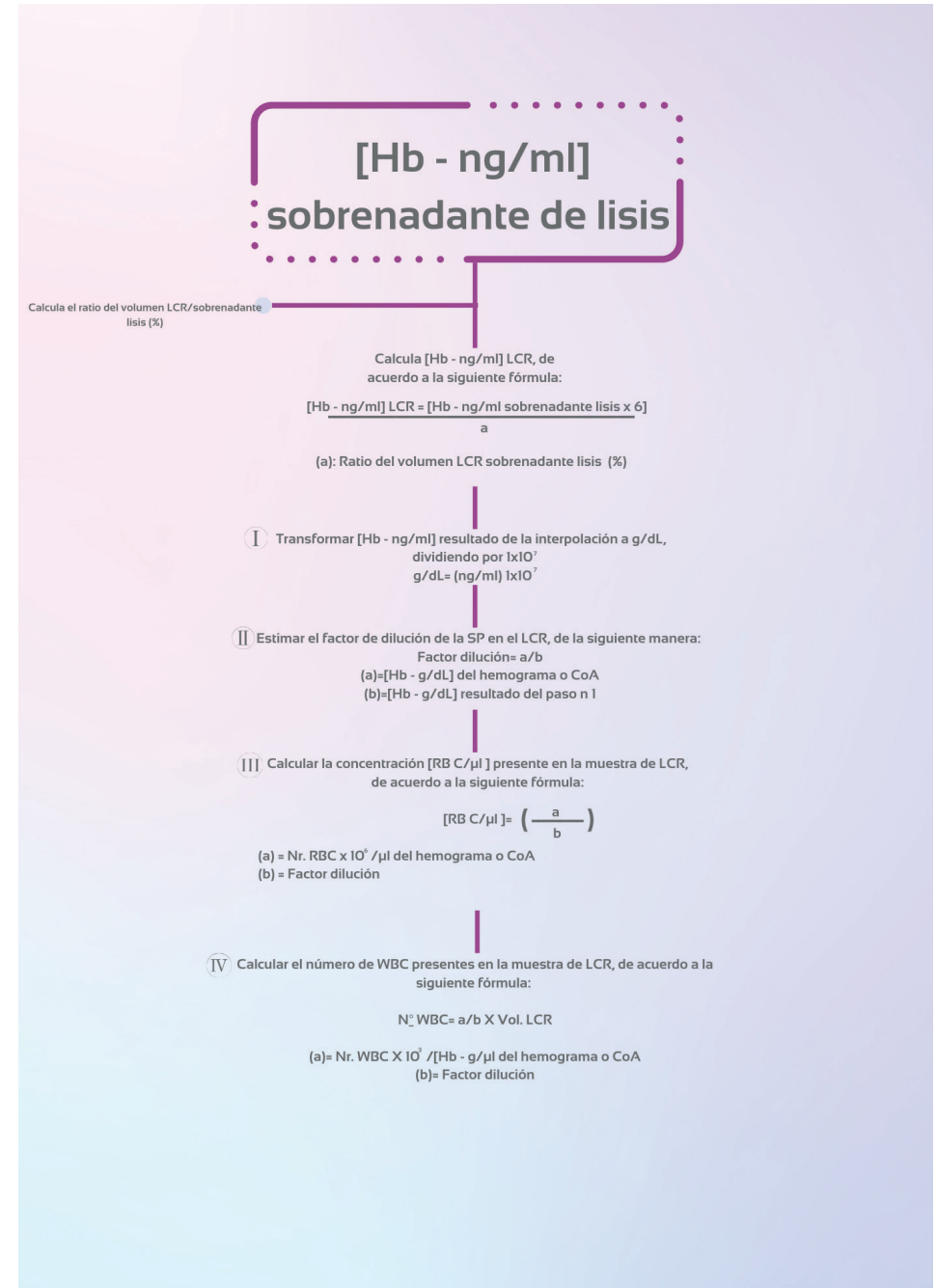
ALLEGATO II. Flusso di lavoro nel tubo del citometro



ALLEGATO III. Diluizione seriale (1:2) dello standard per la costruzione della curva standard



ALLEGATO IV. Interpretazione dei risultati



FCS MUESTRA

