Kit HeMoStep™

Misurazione della contaminazione del sangue periferico nel liquido cerebrospinale

REF	Σ	
IMS1510	100 test	RUO

1. USO PREVISTO

Il kit HeMoStep è un test immunologico in vitro per la misurazione quantitativa della contaminazione ematica
nei campioni di liquido cerebrospinale (CSF) mediante citometria a flusso.

Lo scopo previsto del test è quantificare la contaminazione dei campioni di CSF con sangue periferico, contribuendo, in combinazione con altri test quali la citometria a flusso (FCM) e la citologia (CC), a l'interpretazione accurata dei risultati dell'analisi di questo tipo di campioni (CSF) migliorando il

la diagnosi di malattia leptomeningea in pazienti con linfomi a cellule B e T e leucemie acute di origine linfoide e mieloide.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

L'analisi delle cellule 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 liquido cerebrospinale viene effettuato mediante una procedura chiamata puntura lombare (LP), che prevede l'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 il sangue periferico (PB) può essere introdotto nella provetta contaminando il liquido cerebrospinale. Inoltre, la puntura può talvolta essere complicata da un aumento del sanguinamento, chiamato LP traumatico (fino al 20%), con conseguente contaminazione visibile del campione di CSF. Questo tipo di puntura è chiamato traumatico[1]. Pertanto, la presenza di cellule ematiche e la concentrazione alterata di alcune sostanze dovuta alla contaminazione ematica nel CSF possono complicare l'analisi e confondere la diagnosi.

L'immunofenotipizzazione multiparametrica FCM 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 CSF in pazienti con neoplasie ematologiche come i linfomi a cellule B e T e le leucemie acute di origine linfoide e mieloide, in cui si sospetta un'infiltrazione tumorale del CSF[2-4]. La valutazione della contaminazione del CSF con SP deve essere eseguita 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. In questo senso, sebbene il liquido cerebrospinale sia cristallino, è comune che presenti un'alterazione del colore dovuta a un'emorragia patologica nel sistema nervoso centrale (SNC) o, come già accennato, a una puntura traumatica. In quest'ultimo caso, è difficile valutare il grado di contaminazione solo con l'ispezione visiva, poiché la soglia visiva per la percezione del sangue nel liquido cerebrospinale varia da 400 a 6000 globuli rossi (RBC) per mm[3] secondo diversi autori[1,5-6] e anche una contaminazione ematica visivamente non rilevabile può alterare drasticamente il contenuto del CSF.

Alcuni dei metodi più comunemente utilizzati per la stima della contaminazione del CSF da parte del CMF si basano sull'immunofenotipizzazione e sulla conta delle cellule contaminanti assolute dal sangue periferico, principalmente RBC e/o neutrofili. Tuttavia, tali protocolli presentano dei limiti (bassa precisione e bassa sensibilità) legati alla perdita di cellule durante le fasi di concentrazione/centrifugazione, ma anche alla distruzione delle cellule dovuta ai rapidi effetti citotossici in vitro del CSF sui leucociti e quindi sui neutrofili[7].

La valutazione della qualità del campione di CSF è essenziale nella diagnosi e nel follow-up delle leucemie e dei linfomi e disporre di un metodo che aggiri gli svantaggi associati alla distruzione cellulare di questo tipo di analisi può essere un fattore determinante per ottenere buoni risultati.

Questo kit, basato sulla quantificazione dell'emoglobina totale (Hb), un biomarcatore specifico per i globuli rossi, aiuta a interpretare i risultati diagnostici, poiché aggira i problemi derivanti dalla citotossicità del CSF, riduce al minimo l'utilizzo del campione, particolarmente importante nei campioni paucicellulari[2,8] e migliora significativamente la sensibilità per la determinazione della contaminazione del CSF con PB

3. PRINCIPIO DELLA METODOLOGIA

Il kit HeMoStep è un test immunologico sandwich monoplex (a popolazione singola) che consente la cattura e il rilevamento di un analita solubile (Hb).

Il test si basa su microsfere rivestite con un anticorpo di cattura e marcate internamente con fluorescenza a FL3 (685 nm), che presentano un pattern di intensità di fluorescenza discreto con un trasferimento minimo 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. Le microsfere vengono quindi lavate per rimuovere il resto del campione e successivamente incubate con l'anticorpo rivelatore, coniugato con fluorescenza 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 kit HeMoStep.** Una fiala da 5,5 ml (45 µl/test).
BEADS	**Microsfere di cattura rivestite con un anticorpo monoclonale specifico per l'emoglobina** . Microsfere magnetiche in polistirene (diametro medio 6 µm), fornite in 1 fiala 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% (NaN_3), 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 10 mM di sodio fosfato, 150 mM di NaCl, pH 7,4, contiene l'agente antimicrobico KATHON™. Diluire il contenuto del tampone di analisi 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 liofilizzati.** Solubilità H_2 O. Ricostituire prima dell'uso.
STD	**Standard di concentrazione nota. 1 fiala di lisato di globuli rossi liofilizzato con concentrazioni note di [Hb].** Solubilità H_2 O. 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), utilizzare la concentrazione e la soluzione acquosa tamponata contenente stabilizzatore proteico e azoturo di sodio allo 0,09% (NaN_3) come agente antimicrobico.
	Istruzioni per l'uso.

b) Materiali, reagenti e attrezzature necessari non forniti

- Citometro a flusso dotato di almeno 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 con un intervallo di 1-1000 µL e puntali monouso corrispondenti.
- Puntali per pipette.
- Pipette Pasteur.
- Rack magnetico; MagneSphere(R) Mag. Sep. Stand a 12 fori, 12x75 mm (PROMEGA, rif. Z5343).
- Provette in polistirene a fondo tondo da 12x75 mm (provette per citometro).
- Provetta Eppendorf da 1,5 ml.
- Soluzione di lisi FACS (BD Biosciences, n. catalogo 349202), da utilizzare durante il protocollo come diluente del campione DILUB e controllo negativo CNTRL-

- PBS; pH 7,4 (soluzione salina tamponata con fosfato) 1X, da utilizzare per la diluizione del tampone di lavaggio 10X e la preparazione del campione.
- Kit di calibrazione (Rif.: IMS1511).
- H2O deionizzata o distillata.
- Timer.
- Guanti monouso.
- Contenitore per rifiuti biologici.

5. CONDIZIONI 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. Dopo l'apertura, i reagenti sono stabili se conservati a una temperatura compresa tra +2 e +8 °C e protetti da contaminazioni. Fanno eccezione i controlli standard e 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, come ultima risorsa, 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 un periodo più lungo di quello strettamente necessario.

6. RACCOMANDAZIONI E AVVERTENZE

⚠ PER USO DIAGNOSTICO 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 di rubinetto prima dello smaltimento. Queste condizioni sono raccomandate 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 del test. Non sostituire o miscelare i reagenti del kit Immunostep con reagenti di altri produttori.

⚠ Prima di acquisire i campioni, è necessario assicurarsi che le impostazioni del citometro a flusso e la loro compensazione siano appropriate.

⚠ Tenere i componenti del kit lontani dall'esposizione diretta alla luce durante il protocollo. Gli anticorpi coniugati con fluorescenza e le microsfere sono sensibili alla luce.

⚠ I campioni devono essere trattati allo stesso modo di quelli che potrebbero trasmettere infezioni. È necessario disporre di metodi di manipolazione adeguati.

⚠ I reagenti non devono essere utilizzati se la confezione mostra chiari segni di deterioramento.

⚠ Indossare 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 gli standard di sicurezza approvati.

⚠ Se i controlli positivi e negativi non sono montati su ogni serie di campioni, è importante ricordare che devono 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 cristallino, ma a seguito di un trauma apparirà di colore rosa, con un contenuto superiore a 400 globuli rossi/µl. In questo caso potrebbe essere necessario eseguire una diluizione per l'analisi secondo la sezione 7.1 della presente scheda tecnica.

7. RACCOLTA DEL CAMPIONE

Per le analisi CMF multiparametriche, raccogliere ≥2 ml di liquido cerebrospinale mediante LP. Conservare il campione in frigorifero a una temperatura compresa tra +2 e +8 °C. Il campione deve essere elaborato entro 1 ora dall'LP, altrimenti deve essere stabilizzato3 a causa degli effetti citotossici del liquido cerebrospinale sui leucociti.

Nel caso specifico di spedizione del campione tra laboratori o a un laboratorio centrale, è necessario stabilizzare il campione direttamente al momento del prelievo; sul mercato sono disponibili diverse soluzioni commerciali che conservano le cellule per alcuni giorni (ad es. 48 ore). Quando il campione stabilizzato arriva in laboratorio, misurare e registrare il volume di CSF ricevuto. Non dimenticare di sottrarre il volume della soluzione stabilizzante utilizzata.

7.1 Preparazione del campione

Quando il campione, con o senza stabilizzante, arriva al laboratorio per l'analisi, misurare e registrare il volume di CSF ricevuto. Non dimenticare di sottrarre il volume della soluzione stabilizzante utilizzata. Quindi 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] filtrato/sterile; pH 7,4. Per la colorazione del campione e la combinazione di anticorpi da utilizzare, si raccomanda di seguire le raccomandazioni EuroFlow[8-9] Dopo la colorazione, aggiungere 2 ml di soluzione di lisi FACS (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 il surnatante di lisi in una provetta separata, 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 del citometro, secondo le raccomandazioni EuroFlow[8-9] .

Il surnatante di lisi è il tipo di campione che può essere analizzato con questo kit, poiché contiene l'analita (Hb) che consente di stimare il grado di contaminazione del CSF con PB.

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

Al momento della preparazione del kit, si raccomanda un'analisi visiva del colore del campione, al fine di determinare se sarà necessario diluirlo utilizzando la soluzione di lisi FACS. A tal fine, è allegata una guida che consente, a seconda del colore, di stimare la diluizione del campione, evitando l'"effetto hook" che si verifica nei campioni con alta concentrazione dell'analita e facilitando l'adeguamento della fluorescenza all'intervallo di interpolazione del
curva di calibrazione (Fig. 1).

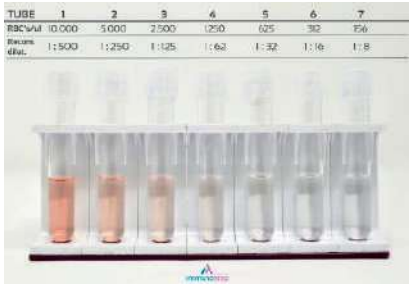


Figura 1: Guida cromatica indicativa corrispondente al campione di supernatante di lisi con diverse concentrazioni di globuli rossi e alla diluizione suggerita da utilizzare.

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

8. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Temperare i reagenti a una temperatura compresa tra +18 °C e +24 °C (temperatura ambiente) 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 della diluizione. Per eseguire la diluizione, prelevare la quantità necessaria per i test dal flacone del concentrato e diluire 1:10 in PBS, pH 7,4.

Ricostituire il controllo standard e quello positivo rispettivamente in 200 e 100 µl di H2O distillata.
Etichettare tante provette di polistirene a fondo tondo da 12x75 mm (provette per citometria) quanti sono i campioni, i controlli, le sfere di calibrazione e le diluizioni della curva di calibrazione da testare. Si raccomanda di preparare repliche di ciascun campione, standard e controllo.

9. PROCEDURA DI ANALISI

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

1 **Preparazione delle microsfere di cattura con il semplice**	Risospendere la fiala di microsfere di cattura agitando con il vortex per circa 20 secondi. Aggiungere 5 µl di microsfere di cattura alle provette etichettate come campione, controlli e curva standard. Aggiungere quindi 45 µl di 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 una pipetta, senza agitare, quindi lasciare equilibrare per 15 minuti a temperatura ambiente. Una volta equilibrato, aggiungere rispettivamente 50 µl del controllo positivo (+) e del controllo negativo (FACS lysing) a ciascuna delle provette contrassegnate come sopra. Agitare con il vortex per circa 20 secondi. Continuare con il punto 5.
3 **Preparazione delle sfere di calibrazione**	Questo passaggio viene eseguito utilizzando il kit di calibrazione (Rif.: IMS1511). La provetta contenente le microsfere di calibrazione deve quindi essere ricostituita aggiungendo 50 µl di caseina per circa 2 minuti. La procedura prosegue al punto 7 (incubazione del coniugato).
4 **Preparazione della curva standard**	Lo standard è fornito in forma liofilizzata e deve essere ricostituito immediatamente prima dell'uso. Il kit contiene una quantità di standard sufficiente per eseguire due curve standard. Per ulteriori informazioni, consultare la sezione 10 del presente documento. Passare al punto 5.
5 **Incubazione del campione**	Incubare le provette (campione, controlli, microsfere di calibrazione e provette della curva standard) per 30 minuti a temperatura ambiente, al buio e sotto agitazione.
6 **Lavaggio**	Dopo l'incubazione, lavare il campione (Hb attaccato alle sfere) una volta utilizzando 1 ml (provetta) di tampone di lavaggio 1X (vedere la sezione 8 - Preparazione dei reagenti) per ogni lavaggio. Lasciare il tampone di lavaggio in ciascuna provetta per 30-60 secondi per ogni lavaggio. Successivamente, raccogliere le sfere magnetiche posizionando le provette in un rack magnetico e incubando per 5 minuti. Le microsfere possono anche essere raccolte mediante centrifugazione a 2500xg per 5 minuti. Rimuovere il surnatante dalle provette mediante decantazione manuale o aspirazione se si utilizza la centrifugazione. Fare attenzione a non disturbare le microsfere e assicurarsi di lasciare un volume minimo di 50 µl e un massimo di 85 µl di surnatante nella provetta.
7 **Incubazione del coniugato**	Aggiungere 10 µl dell'anticorpo rivelatore 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 agitando.
8 **Lavaggio con**	Dopo l'incubazione, lavare una volta come descritto sopra (fase 6).
9 **Misurazione**	Risospendere il campione in 200 µl di PBS e acquisirlo in un citometro a flusso. Conservare al riparo dalla luce per un massimo di 30 minuti a 2-8 °C, fino all'acquisizione sul citometro. Per ulteriori informazioni sulla strategia di analisi e acquisizione, consultare il punto 11 del presente documento.

10. PREPARAZIONE DELLA CURVA STANDARD

Dallo standard di concentrazione nota incluso nel kit, preparare una diluizione seriale a 13 punti (1:2) (Fig. 2), utilizzando FACS lysing come soluzione.

1 **Ricostituzione della liofilizzazione**	Aprire la fiala dello standard liofilizzato e ricostituirlo con 200 µl di H_2 O e mescolare con la pipetta, senza agitare, quindi 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 momenti diversi o due repliche in parallelo.
2 **Eseguire diluizioni seriali**	Etichettare 13 provette Eppendorf da 1,5 ml e disporle nel seguente ordine: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 y 1:4096. Trasferire lo standard ricostituito nella provetta Eppendorf da 1,5 ml contrassegnata con 1:1 e pipettare 100 µl di soluzione di lisi FACS in ciascuna delle altre provette contrassegnate (1:2 - 1:4096). Eseguire quindi diluizioni seriali trasferendo 100 µl dalla provetta standard superiore (1:1) alla provetta di diluizione 1:2 e mescolare bene con la pipetta. Continuare le diluizioni seriali trasferendo 100 µl dalla provetta 1:2 alla provetta 1,4 e così via fino alla provetta 1:4096. Mescolare accuratamente con la pipetta, senza agitare.
3 **Trasferire nelle provette da citometria**	Una volta eseguite 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 si raccomanda di eseguire due repliche della curva standard. Preparare una provetta da 12x75 mm contenente solo soluzione di lisi FACS corrispondente alla concentrazione di 0 ng/ml o al legame non specifico (NSB) e al controllo negativo. Procedere al punto 5 - "incubazione del campione" della procedura di test, paragrafo 9 del presente documento.

Le concentrazioni (ng/ml) dell'analita (Hb) per ciascuna diluizione standard, nonché una descrizione della diluizione seriale (1:2) dello standard incluso nel kit per l'assemblaggio della curva standard sono riportate nell'ALLEGATO II.

Con l'uso delle sfere di calibrazione non è necessario generare una curva di calibrazione ogni giorno di

test. Sarà necessario generare una nuova curva standard solo nei seguenti casi:

- Quando si utilizza un kit di reagenti di un nuovo lotto.
- Quando la configurazione del citometro a flusso è stata modificata. Per ulteriori informazioni, consultare il punto 12 del presente documento.

11. ACQUISIZIONE DEL TEST E STRATEGIA DI ANALISI AUTOMATIZZATA

I file FCS generati da questo test possono essere analizzati automaticamente utilizzando il software CYTOSTEP. Il software consente di costruire la curva di calibrazione, interpolare il file FCS corrispondente ai campioni, calcolare i livelli di contaminazione e generare un rapporto dettagliato dei risultati. Inoltre, CYTOSTEP esegue i controlli di qualità necessari per garantire la calibrazione e l'accuratezza dell'adattamento della curva. L'applicazione è progettata per essere intuitiva e accessibile anche agli utenti non esperti. Se utilizzato in combinazione con il kit HeMoStep, fornisce una soluzione completa per la quantificazione della contaminazione nelliquidi come il liquido cerebrospinale o pleurico. Come indicato nelle sezioni seguenti di questa scheda tecnica, i risultati possono anche essere analizzati manualmente.

12. ACQUISIZIONE MANUALE DEL TEST CITOMETRICO E STRATEGIA DI ANALISI DEL TEST CITOMETRICO

Una corretta strategia di selezione della popolazione di microsfere deve consentire la rimozione di doppioni e detriti, contribuendo alla corretta identificazione della popolazione di microsfere.

12.1 Strategia per l'analisi dei campioni, dei controlli e della curva di calibrazione

Si raccomanda una prima fase di screening della popolazione di microsfere sul modello FSC-H/FSC-A per rimuovere i doppioni (A), seguita da uno screening della popolazione di microsfere sul grafico a punti SSC-A/FSC-A per rimuovere lo sporco residuo e ridurre il background (B), consentendo la corretta identificazione della popolazione di microsfere su un grafico a punti per uno qualsiasi dei seguenti canali PerCP/ APC, PerCP-Cy5/APC o PerCP-Cy5.5/APC (C).

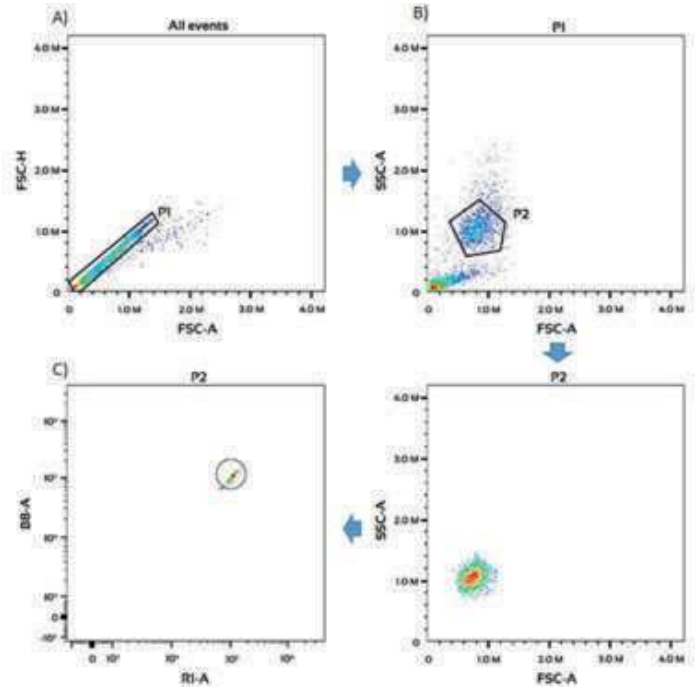


Figura 2: Strategia di analisi per la selezione della popolazione di microsfere nei grafici a punti FSC-H/FSC-A (A); SSC/ FSC (C) e PerCP/APC (C).

13. ANALISI DEI RISULTATI

13.1 Generazione della curva standard

Il test quantitativo utilizza una funzione logistica a quattro parametri (4PL) per convertire il segnale MFI in concentrazioni.

Il primo passo consiste nel generare la curva standard utilizzando un software in grado di generare una curva standard che si adatti a questo tipo di regressione (Fig. 4). In alternativa, è possibile costruire una curva standard tracciando l'MFI per ciascuno standard sull'asse lineare (y) rispetto alla concentrazione su un asse logaritmico (x) (X=Log(X)) e tracciare la curva che meglio si adatta ai punti sul grafico. Non includere NSB nella curva standard.

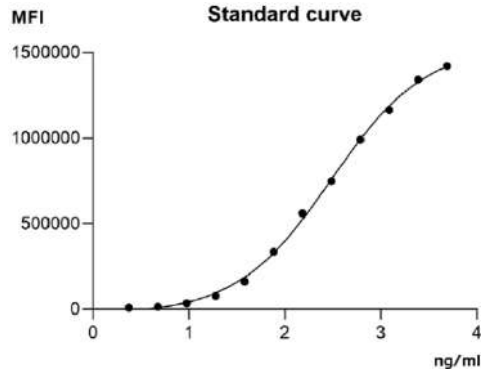


Figura 3: Curva standard modello, solo a titolo indicativo. È necessario costruire una curva standard per ogni lotto di kit utilizzato.

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

I 4 parametri stimati sono i seguenti:
(a) = il valore minimo ottenibile (cioè ciò che accade alla concentrazione 0)
(d) = il valore massimo ottenibile (cioè ciò che accade a concentrazione infinita (c) = il punto di flesso (cioè il punto sulla 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 sono calcolati dal software che stiamo utilizzando).

Essi descrivono una curva a forma di sigma, come mostrato di seguito (Fig. 4):

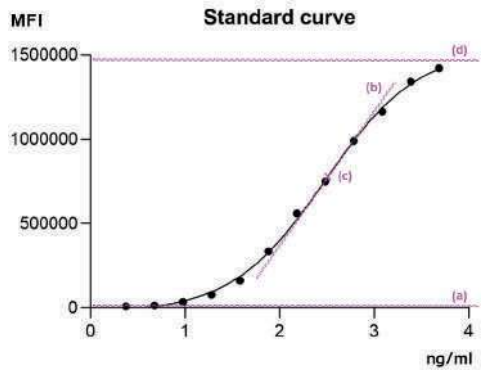


Figura 4: Curva a forma sigmoide corrispondente all'equazione del modello di regressione logistica a quattro parametri (4PL).

Mentre l'equazione riorganizzata per 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 e i parametri (a) e (d) definiscono la posizione della curva e le unità di (y). Se il citometro a flusso è sottoposto a una corretta manutenzione e calibrazione, la forma della curva standard è stabile e quindi è possibile calibrare questa funzione 4PL non lineare con solo due calibratori e le informazioni corrispondenti ai parametri di forma della curva (b) e (c).

Le sfere di calibrazione, specifiche per ogni lotto del kit, sono due popolazioni di sfere corrispondenti ai parametri della curva (a) e (d). Queste microsfere devono essere acquisite in ogni ciclo di test, il che consente di verificare che i valori MFI rientrino in un intervallo di confidenza (CI) del 95%, consentendo l'uso della curva standard senza necessità di calibrazione, oppure, se sono al di fuori di questo CI del 95%, consentiranno di adattare la posizione della curva, senza che sia necessario 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 MFI compresi tra (a) e (d). I campioni al di fuori dell'intervallo determinato da (a) e (d) non possono essere calcolati.

13.3 Analisi di bontà di adattamento della curva standard

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

13.3.1 Ricalcolo dello standard

Ciò comporta il calcolo delle concentrazioni di ciascuna delle diluizioni dello standard che danno origine alla curva standard dopo che la regressione è stata completata e quindi il loro confronto con il valore di concentrazione effettivo utilizzando la formula:

[obs] / ([exp]) x 100

[obs] = concentrazione osservata
[exp] = concentrazione prevista

Questo metodo fornisce informazioni sull'errore relativo nel calcolo del campione, con ciascuno standard che dovrebbe idealmente rientrare tra il 70 e il 130% del valore reale, sebbene sia possibile utilizzare intervalli più ristretti se si desidera una maggiore accuratezza. Pertanto, i risultati per i 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 dosaggio, nonché l'analisi di regressione, consentendo di valutare l'accuratezza complessiva del dosaggio. A tal fine, viene utilizzato e analizzato il controllo positivo con concentrazione nota dell'analita per determinare la somiglianza 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: [obs]/([exp]) x100. 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 di Hb interpolando i valori MFI dei campioni sulla curva standard. Quindi calcolare l'antilogaritmo (X = $10^{(X)}$ del valore risultante dall'interpolazione per ottenere il valore di concentrazione di [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.

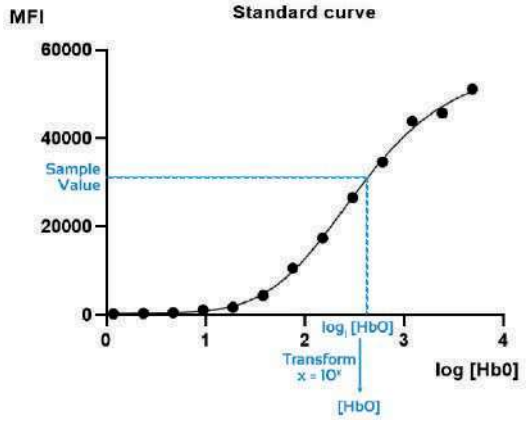


Figura 5: Esempio di interpolazione del risultato MFI per un campione sulla curva standard e calcolo della concentrazione [Hb] nel campione.

13.5 Interpretazione dei risultati

Tradizionalmente, la contaminazione del CSF con PB dovuta a LP traumatica è stata espressa in [RBC/µl]. Pertanto, per una migliore interpretazione e standardizzazione dei risultati, si raccomanda di esprimere il grado di contaminazione in [RBC/µL].

A tal fine, dal risultato della concentrazione di [Hb] del surnatante di lisi (punto 13.4) e utilizzando il volume di CSF registrato (punto 7.1) e i valori della concentrazione di emoglobina (g/dL) e della conta eritrocitaria (numero di RBC x10(^{6}) /µl) dal liquido spinale del paziente o dal CoA, nel caso in cui non sia disponibile la conta ematica, calcolare la concentrazione [RBC/µl] nel liquido cerebrospinale, seguendo il flusso di lavoro descritto nell'ALLEGATO III.

Allo stesso modo, come risultato del calcolo del fattore di diluizione del PB nel CSF, descritto nell'APPENDICE III, è anche possibile stimare il numero di leucociti (WBC) presenti nel campione di CSF dalla contaminazione SP. Per ulteriori informazioni, consultare l'ALLEGATO III.

Tradizionalmente, la contaminazione del CSF con PB dovuta a LP traumatica è stata espressa in [RBC/µl]. Pertanto, per una migliore interpretazione e standardizzazione dei risultati, si raccomanda di esprimere il grado di contaminazione in [RBC/µL].

A tal fine, dal risultato della concentrazione di [Hb] del surnatante di lisi (punto 13.4) e utilizzando il volume di CSF registrato (punto 7.1) e i valori della concentrazione di emoglobina (g/dL) e della conta eritrocitaria (numero di RBC x10(^{6}) /µl) dal liquido spinale del paziente o dal CoA, nel caso in cui non sia disponibile una conta ematica, calcolare la concentrazione di [RBC/µl] nel liquido cerebrospinale, seguendo il flusso di lavoro descritto nell'ALLEGATO IV.

Allo stesso modo, come risultato del calcolo del fattore di diluizione del PB nel CSF, descritto nell'APPENDICE III, è anche possibile stimare il numero di leucociti (WBC) presenti nel campione di CSF dalla contaminazione SP. Per ulteriori informazioni, consultare l'ALLEGATO IV.

È possibile stabilire la relazione tra il numero di globuli bianchi (WBC) attribuibili alla contaminazione ematica e il numero totale di cellule patologiche rilevate nel liquido cerebrospinale (CSF). Ulteriori informazioni sono disponibili nell'ALLEGATO V. Questi dati derivano in genere da un'analisi immunofenotipica parallela condotta sul campione di CSF per valutare la potenziale infiltrazione cellulare, comprendente la conta assoluta delle cellule patologiche.

La stima dei leucociti contaminanti e il numero di cellule patologiche identificate mediante immunofenotipizzazione consentono di valutare se la contaminazione è clinicamente significativa.

Inoltre, se si determina che la contaminazione è rilevante e si dispone della percentuale di cellule patologiche circolanti nel sangue periferico, è possibile valutare se l'infiltrazione osservata nel CSF è dovuta a tale contaminazione (falso positivo) o se, al contrario, si tratta di una vera infiltrazione tumorale. In quest'ultimo caso, il conteggio potrebbe essere corretto scontando le cellule patologiche attribuibili alla contaminazione, consentendo così una stima più accurata del carico tumorale nel CSF. Per ulteriori dettagli, si rimanda all'ALLEGATO V.

13.6 Valori attesi

Lo studio è stato condotto su 105 campioni di CSF, che sono risultati privi di contaminazione mediante ispezione visiva. Il campione analizzato era il surnatante di lisi risultante dal trattamento del campione e sono stati ottenuti i seguenti risultati:

	Tutti i campioni			Campioni di puntura lombare traumatica)		
	Media	95° percentile	n	Media	95° percentile	n
	1201	34,47 - 2368	105	1845	288 - 3402	34
RBC/µl*	38	9 - 67	82	101	21 - 182	29

Calcolato in conformità al punto 13.4 del presente documento.

Ogni laboratorio dovrebbe studiare i valori attesi per la propria popolazione campione e, se necessario, determinare i propri intervalli di riferimento.

14. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

14.1 Capacità di rilevamento

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

- Il limite di rilevabilità (LoD) del test o la concentrazione minima rilevabile dell'analita mediante il test è [3,15 ng/ml] di Hb.
- Il limite di quantificazione (LoQ) del test o la concentrazione minima dell'analita che può essere quantificata con precisione è [3,23 ng/ml] di Hb

14.2 Precisione

Per lo studio di precisione intra-laboratorio, sono stati selezionati quattro (4) campioni (negativo, LoD, controllo positivo e campione positivo) e, seguendo le raccomandazioni CLSI (EP05-A3), Valutazione della precisione della misurazione quantitativa. È stato selezionato un disegno sperimentale 20 x 2 x 2, consistente in uno studio della durata di almeno 20 giorni, con due serie per ogni giorno in cui viene condotto il test e con due repliche per campione testato in ogni serie. Lo studio è stato condotto su un unico strumento. I risultati sono stati i seguenti:

		All'interno della serie	Tra le serie	Tra i giorni	All'interno del laboratorio
Pos	n	3,74			
	Valore 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
Controllo +	n	78			
	Valore 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			
	Valore 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			
	Valore 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

Analogamente, è stato condotto uno studio di riproducibilità con un disegno sperimentale 5x2x2, consistente in uno studio 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

		All'interno del laboratorio
Positivo	n	20
	Valore medio	131,9645973
	SD	37,6628082
	CV	23,19
LoD	n	14
	Valore medio	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 kit HeMoStep (y) su un totale di 29 campioni classificati come LP traumatico in base al colore rossastro del liquido cerebrospinale e/o all'osservazione di un pellet cellulare di colore rosso dopo centrifugazione del campione, mostrando una buona correlazione lineare diretta (r = 0,9081; p: <0,0001) tra le variabili numero di granulociti e numero di globuli rossi calcolate con ciascun metodo.

14.5 Specificità analitica

Le emorragie patologiche del SNC provocano lo stravaso di globuli rossi che si lisano nel liquido cerebrospinale, con conseguente catabolismo dell'emoglobina in bilirubina[11] . Quest'ultimo si verifica 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 sulle prestazioni del test. A tal fine, sono stati selezionati campioni di CSF e contaminati artificialmente con SP e addizionati con 0,4 mg/ml di bilirubina. I campioni sono stati quindi trattati e analizzati secondo le istruzioni del kit e in nessun caso sono state osservate differenze significative tra i campioni arricchiti di bilirubina e quelli non arricchiti

Inoltre, sono state valutate le possibili interferenze delle soluzioni stabilizzanti del CSF disponibili in commercio, quali
sono stati analizzati anche TransFix (Cytomark) e Streck Cell Preservative (Streck Inc). Sono stati selezionati campioni di CSF sono stati selezionati e contaminati artificialmente con PB, quindi diluiti con TransFix in rapporto 1:10 e 1:20 e Streck Cell Preservative utilizzando una diluizione 1:10, e lasciati stabilizzare per una notte (O/N) a 4 °C. Tutti i casi sono stati confrontati con CSF contaminato senza interferenti o stabilizzanti. I campioni sono stati testati secondo le istruzioni del kit e in nessun caso sono state riscontrate differenze significative tra i campioni.

15. LIMITI 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 la sezione
  12.2 di questo documento per ulteriori informazioni.
- I risultati del dosaggio dipendono dalla corretta esecuzione delle procedure di raccolta e trattamento dei campioni
  eseguite correttamente.
- Per la conversione del risultato [Hb - ng/ml] del surnatante di lisi in [RBC/µl] nel CSF, si presume che il volume di FACS lisante utilizzato sia 2000µl. Per ulteriori informazioni, consultare l'ALLEGATO III.

16. BIBLIOGRAFIA

1. Kaushal H Shah- et al (2003). Incidenza della puntura lombare traumatica. Acad Emerg Med. Feb;10(2):151-4.
2. Sancho, J.-M. et al. (2010) "Significato clinico del coinvolgimento occulto del liquido cerebrospinale valutato mediante citometria a flusso in pazienti affetti da linfoma non Hodgkin ad alto rischio di malattia del sistema nervoso centrale nell'era del Rituximab", European Journal of Haematology, 85(4),
   pp. 321–328.
3. Kraan, J. et al. (2008) "Immunofenotipizzazione citometrica a flusso del liquido cerebrospinale", Current Protocols in Cytometry, 45(1).
4. Subirá, D. et al. (2002) "Analisi citometrica a flusso di campioni di liquido cerebrospinale e sua utilità nella pratica clinica di routine", American Journal of Clinical Pathology, 117(6), pagg. 952-958.
5. Patten, B.M. (1968) "Quanto sangue rende sanguinante il liquido cerebrospinale?", JAMA: The Journal of the American Medical Association, 206(2), p. 378.
6. Chow, G. e Schmidley, J.W. (1984) "Lisi degli eritrociti e dei leucociti nelle punture lombari traumatiche", Archives of Neurology, 41(10), pagg. 1084-1085.
7. Dux, R. et al. (1994) "Un protocollo standardizzato per l'analisi citometrica a flusso delle cellule isolate dal liquido cerebrospinale", Journal of the Neurological Sciences, 121(1), pp. 4-78.
8. Quijano, S. et al. (2009) "Identificazione della malattia leptomeningea nel linfoma non Hodgkin aggressivo a cellule B: maggiore sensibilità della citometria a flusso", Journal of Clinical Oncology, 27(9), pagg. 1462-1469.
9. Van Dongen, J.J. et al. (2012) "Pannelli di anticorpi EuroFlow per l'immunofenotipizzazione citometrica a flusso n-dimensionale standardizzata di leucociti normali, reattivi e maligni", Leukemia, 26(9), pagg. 1908-1975.
10. Procedura operativa standard (SOP) EuroFlow per la preparazione di campioni di liquido cerebrospinale (CSF) e la colorazione in provette piccole (SST); EuroFlow, 2024.
11. CLSI. Analisi dei fluidi corporei per la composizione cellulare; Linee guida approvate, H56-A. Istituto per gli standard clinici e di laboratorio; 2006.

17. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI

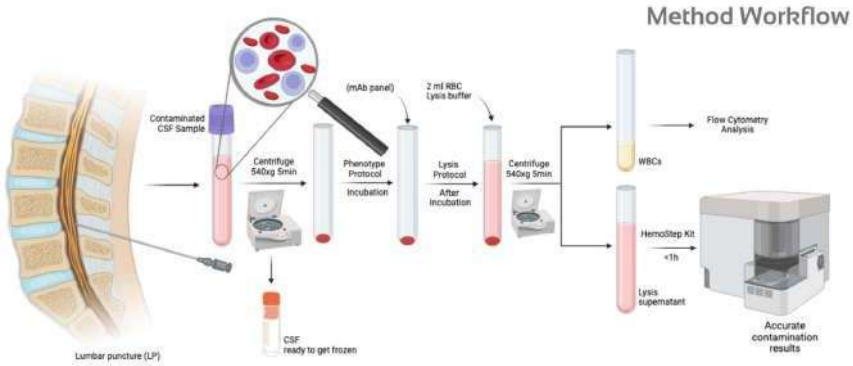
Σ	Il contenuto è sufficiente per <n> analisi
REF	Riferimento o identificativo del prodotto
CE	Etichettatura CE
IVD	Dispositivo diagnostico *in vitro*
	Produttore
	Data di scadenza
LOT	Codice lotto
	Seguire le istruzioni per l'uso
	Conservazione da x°C a y°C
	Contenuto di ciascun test
	Prestare attenzione a
	Rischi biologici
BEADS	Sfere di cattura
WASHBUF 10X	Tampone di lavaggio 10
CNTRL+	Controllo positivo Sferette
CAL	di calibrazione
STD	Standard di concentrazione nota Anticorpo
CONJ IgG	rivelatore coniugato con fluorescenza

18. PRODUTTORE IMMUNOSTEP S.L.

Indirizzo: Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Centro di Ricerca sul Cancro (C.I.C)
Campus de Unamuno
37007 Salamanca (Spagna)

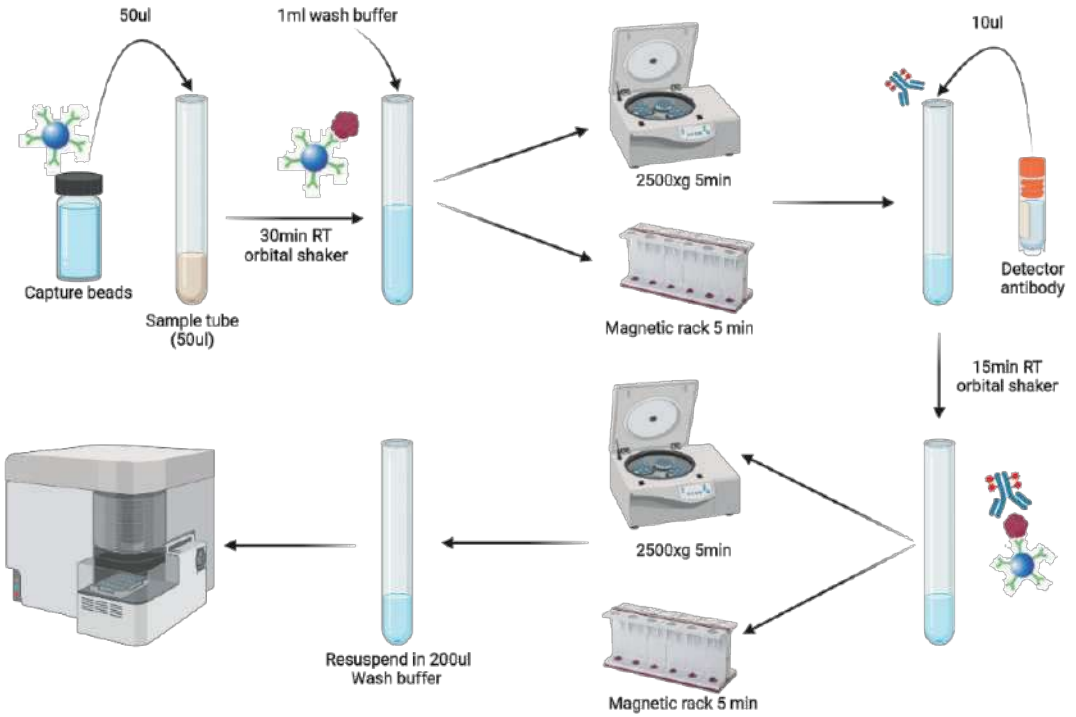
Tel./fax: (+34) 923 294 827
E-mail: info@immunostep.com
www.immunostep.com

ALLEGATO I. Preparazione dei campioni di CSF

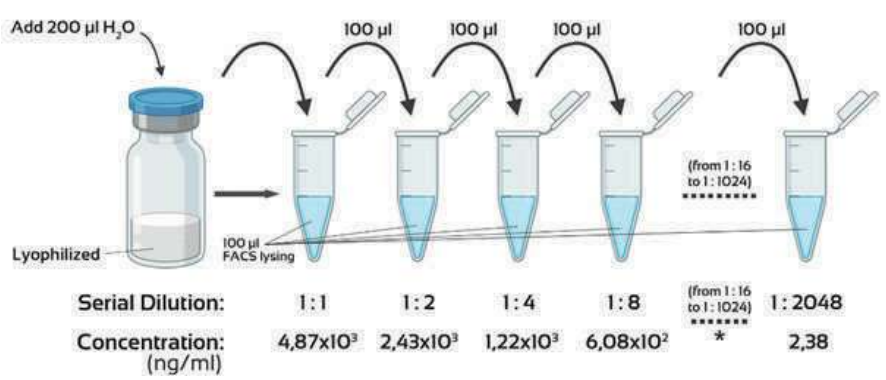


* Annotazione: la preparazione del campione di liquido cerebrospinale è conforme alla procedura operativa standard (SOP) Euroflow.

ALLEGATO II. **Flusso di lavoro del citometro**



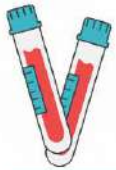
ALLEGATO III. **Diluizione seriale (1:2) dello standard per la costruzione della curva standard**



*From 1:16 to 1:1024

Serial Dilution	Concentr. (ng/ml)
1:16	38,0
1:32	19,0
1:64	9,50
1:128	4,75
1:256	2,38
1:512	9,50
1:1024	4,75
FACS lysing (B_0)	0,00

ALLEGATO IV. **Interpretazione dei risultati**



KIT RESULT:
[Hb - ng/ml]
LYSIS SUPERNATANT

If dilution is applied, multiply **[Hb lysis sup]** x sup dilution

INITIAL CALCULATION

Calculate **[Hb CSF]** (ng/ml), according to the following formula:

$$[\text{Hb CSF}]\ (\text{ng/ml}) = \frac{[\text{Hb Lysis sup}]\ (\text{ng/ml}) \times 6}{a}$$

(a) = (CSF Vol./ lysis sup. Vol.)

I TRANSFORMATION

Transform [Hb CSF] (ng/ml) to (g/dL):

$$[\text{Hb CSF}]\ (\text{g/dL}) = [\text{Hb CSF}]\ (\text{ng/ml}) \times 1 \cdot 10^{-7}$$

II DILUTION FACTOR

Estimate the PB dilution factior in the CSF as follows:

$$\text{Dilution factor} = \left(\frac{a}{b}\right)$$

(a) = [Hb from the blood count or CoA] (g/dL)
(b) = [Hb CSF] (g/dL), result from Step I

III RBC CONCENTRATION IN CSF

Calculate the concentration [RBC/µl] present in the CSF sample, according to the following formula:

$$[\text{RBC/µl}] = \left(\frac{a}{b}\right)$$

(a) = RBC count from the blood count or CoA
(b) = Dilution factor

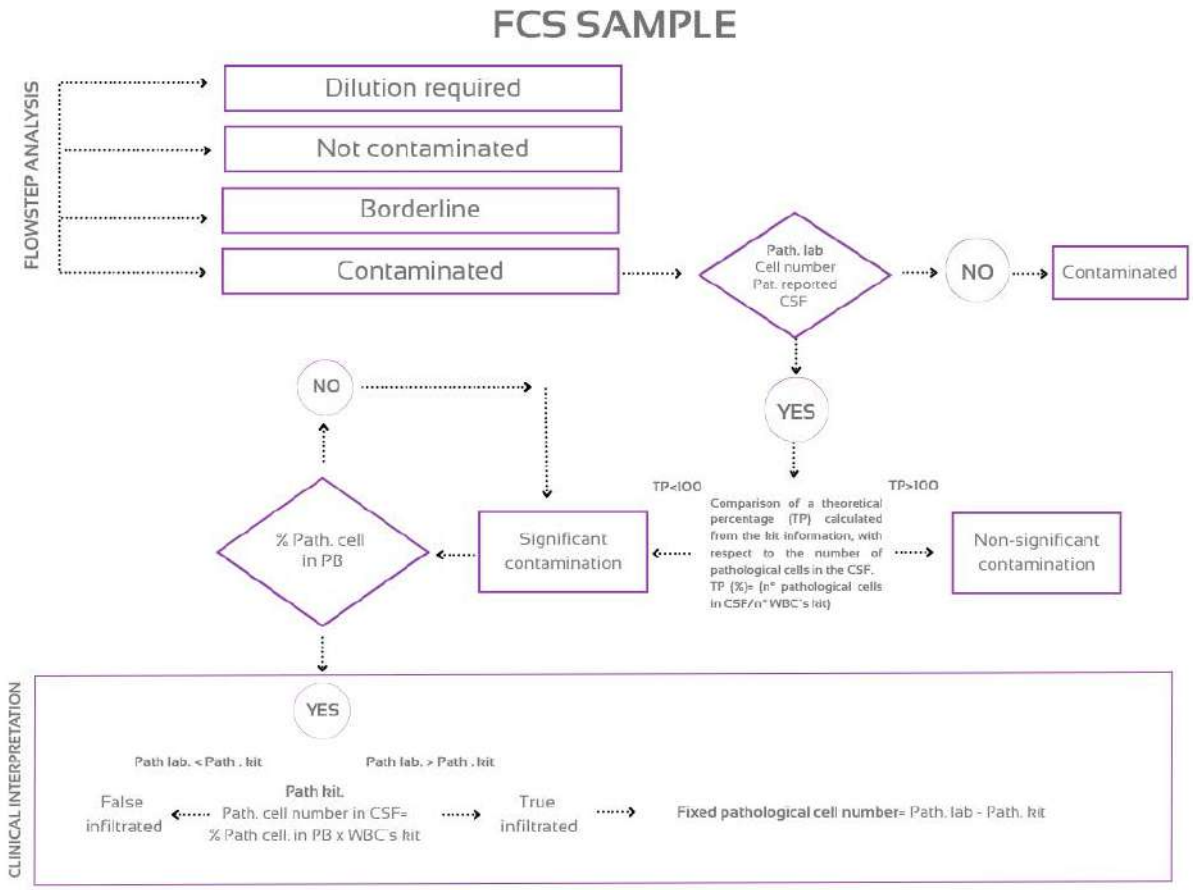
IV NUMBER OF WBC IN CSF

Calculate the number of WBC present in teh CSF sample, according to the following formula:

$$\text{No. WBC} = \left(\frac{a}{b}\right) \times \text{CSF Vol.}$$

(a) = WBC count from the blood count or CoA
(b) = Dilution factor

GLOSSARY
Hb: Hemoglobin
CSF: Cerebrospinal fluid
Sup: Supernatant
CoA: Certificate of analsis
PB: Peripheral blood


FCS SAMPLE
FLOWSTEP ANALYSIS
Dilution required
Not contaminated
Borderline
Contaminated
Path. lab Cell number Pat. reported CSF
NO
Contaminated
YES
NO
TP<100
TP>100
Comparison of a theoretical percentage (TP) calculated from the kit information, with respect to the number of pathological cells in the CSF.
TP (%)= (n° pathological cells in CSF/n° WBC's kit)
Significant contamination
Non-significant contamination
% Path. cell in PB
CLINICAL INTERPRETATION
YES
Path lab. < Path . kit
Path lab. > Path . kit
False infiltrated
Path kit. Path. cell number in CSF= % Path cell. in PB x WBC's kit
True infiltrated
Fixed pathological cell number= Path. lab - Path. kit