

## FMH **QuikQuant**™

### Test rapido di quantificazione dell'emorragia fetomaterna

REF QF-100

▽ 100 tests

i package insert

IVD **CE** *Per diagnostica in vitro*

#### Usò previsto

IQ Products FMH QuikQuant™ deve essere utilizzato nei laboratori clinici ospedalieri e nei laboratori di riferimento da parte di personale tecnico medico qualificato o di analoghi operatori con esperienza nei metodi di analisi dell'emorragia fetomaterna.

#### Sommario e principio d'impiego

La principale applicazione della rilevazione di RBC fetali è l'analisi dell'emorragia fetomaterna (FMH) [1-4]. L'FMH si verifica normalmente durante l'intero periodo della gravidanza in minuscole quantità per aumentare di volume nelle ultime fasi di gestazione [5]. Una significativa differenza di antigenicità RBC tra feto e madre può portare all'allosensibilizzazione del sistema immunitario materno prima o dopo il parto. Gli anticorpi materni contro gli antigeni RBC fetali possono essere clinicamente silenti o causare postumi autoimmuni potenzialmente letali per la gravidanza in corso o quelle successive (come, ad esempio, eritroblastosi fetale o aborto precoce). Tale sensibilizzazione può verificarsi con qualsiasi differenza negli antigeni RBC, ma i casi più frequenti e dalle conseguenze cliniche più gravi sono quelli di differenze di Rh o antigene D. La rilevazione e la quantificazione delle RBC fetali sono una componente essenziale della gestione delle pazienti con FMH trattate con preparati a base di immunoglobulina Rh (RhIG) [6]. L'impiego della profilassi con immunoglobulina Rh è universalmente diffuso, ma dosaggi e tempi di somministrazione variano da una regione del mondo all'altra [7, 8]. Pertanto la sensibilità e la specificità dei test di rilevazione per l'FMH sono un fattore cruciale per l'efficacia terapeutica e relativi esiti clinici.

Il test più diffuso per la rilevazione dell'FMH è il metodo Kleihauer-Betke (KB) del conteggio visivo al microscopio, basato sulle differenze nelle proprietà di solubilità in condizioni di acidità dell'emoglobina fetale (HbF) rispetto all'emoglobina di soggetto adulto [9]. Il metodo KB è di facile esecuzione per la maggior parte dei laboratori clinici ma presenta una sensibilità ridotta e mostra una mediocre riproducibilità o precisione (CV di 50-100%) [10, 11]. I metodi di citometria a flusso sono stati sviluppati utilizzando le differenze negli antigeni o la valutazione quantitativa dell'emoglobina fetale (HbF) per distinguere le RBC fetali dalle RBC adulte. Tali metodi sono più precisi e meno soggettivi [12-22]. Nonostante ciò, molti laboratori continuano ad adottare il metodo KB a causa della diffusione limitata della citometria a flusso.

IQ Products FMH QuikQuant™ è un metodo di citometria a flusso per la rilevazione e quantificazione dell'FMH. Il test utilizza un anticorpo monoclonale anti-emoglobina fetale e un reagente allo ioduro di propidio in una tecnica senza lavaggio la cui esecuzione richiede circa 30 minuti. Fa dunque risparmiare 10 minuti al tecnico di laboratorio ed è più efficiente nonché più sensibile e preciso rispetto al test KB.

#### Applicazione

La determinazione di laboratorio dei livelli di cellule fetali presenti nel circolo sanguigno materno rimane un importante strumento ausiliario nella gestione ostetrica di pazienti con sospetto trauma uterino e nella somministrazione di dosi adeguate di immunoglobulina Rh.

## Componenti del prodotto

- 1,0 ml di Reagente anticorpo IQ Products FMH QuikQuant™ per citometria a flusso (100 test)
- 30 ml di soluzione di permeabilizzazione IQ Products Intra-Cell™ – fornito come concentrato 10X
- 45 ml di soluzione Tampone IQ Products FMH QuikQuant™ – fornito come concentrato 10X

## Reagenti e materiali necessari non in dotazione

- Provette 12 x 75 mm monouso in polistirene con rack
- Punte per pipetta, (1-200 µl) e (200-1000 µl)
- Pipette a volume variabile (0-200 e 200-1000 µl)
- Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) o PBS di Dulbecco Sigma P3813 o CellGro 21-031-CM
- Glutaraldeide (0,03% ± 0,015%)
  - 8 % glutaraldeide per diluizione Sigma G 7526 o Polysciences 00216A
- **OPPURE**
  - 25% glutaraldeide per diluizione Sigma G 5882 o Polysciences 01909
- Acqua per la preparazione di reagenti, preferibilmente filtrata
- Installazione di un filtro a vuoto da 0,2 µm (opzionale ma consigliata)
- FETALtrol™ (IQ Products) o sangue cordonale di propria preparazione per 3 livelli di controllo per analisi di emorragia fetomaterna
- Miscelatore vortex
- Lavatore cellulare o centrifuga per banca del sangue in grado di raggiungere 600 x g.
- Citometro a flusso multiparametrico, in grado di leggere almeno 3 parametri di fluorescenza
- Software per analisi di file listmode in formato FCS

## Preparazione del reagente

### 1 PBS

- PBS di Dulbecco 1000 ml CellGro 21-031-CM  
o equivalente
- **OPPURE**
- Soluzione salina tamponata con fosfato in polvere 1 pacchetto Sigma P 3813 o equivalente
- H<sub>2</sub>O per la preparazione di reagenti QS per 1000 ml
- Miscelare bene
- Filtrare con filtro a vuoto dai pori di 0,2 µm, se disponibile, per rimuovere i detriti di particolato
- Regolare il pH a 7,4 quando la soluzione raggiunge la temperatura ambiente (20-25 °C)
- Conservare in frigorifero a 2-8 °C
- Scadenza: da determinare secondo la normale prassi di laboratorio. L'uso di acqua sterile/filtrata come diluente prolunga la durata del preparato a 30 giorni a temperature di 2-8 °C.

### 2 Soluzione di lavoro Tampone FMH QuikQuant™ – equivalente a PBS con BSA (0,5%)

- H<sub>2</sub>O per la preparazione di reagenti 9 parti
- Concentrato di Tampone IQ Products FMH QuikQuant™ 1 parte

#### **Per esempio: 9 ml di H<sub>2</sub>O e 1 ml di concentrato BSA IQ Products combinati**

- Miscelare bene
- Filtrare con filtro a vuoto dai pori di 0,2 µm, se disponibile, per rimuovere i detriti di particolato
- Regolare il pH a 7,4 quando la soluzione raggiunge la temperatura ambiente (20-25 °C)
- Conservare in frigorifero a 2-8 °C

- Scadenza: da determinare secondo la normale prassi di laboratorio. L'uso di acqua sterile/filtrata come diluente prolunga la durata del preparato a 30 giorni a temperature di 2-8 °C.

### 3 Diluizione "di lavoro" di glutaraldeide: 0,03%

**Nota** - Poiché la purezza della glutaraldeide può variare da produttore a produttore e da lotto a lotto, prendere in considerazione concentrazioni di 0,02-0,05% per ottimizzare la separazione della colorazione di globuli rossi fetali e materni con il test (preferibilmente una separazione di 2 log o maggiore).

Conservare la **soluzione madre** di glutaraldeide nel congelatore (è possibile ripartire le fiale in microprovette in polipropilene e ricongelare) o nel frigorifero, seguendo le istruzioni del produttore. Preparare una soluzione "di lavoro" fresca per ogni giorno di utilizzo

- **8%**, per ME I Soluzione madre di glutaraldeide 94 ul Sigma G7526 o Polysciences 00216A
- PBS (pH 7,4) 25 ml (vedere PBS sopra)

#### OPPURE

- **25%**, per ME I Soluzione madre di glutaraldeide 30 ul Sigma G5882 o Polysciences 01909
- PBS (pH 7,4) 25 ml (vedere PBS sopra)
- Miscelare bene e conservare in frigorifero (2-8 °C) fino a 2 ore prima dell'uso
- Scadenza: eliminare la glutaraldeide diluita non utilizzata / Controllare la scadenza della soluzione madre di glutaraldeide sul contenitore del produttore.

### 4 IQ Products *Intra-Cell*<sup>™</sup> per la permeabilizzazione delle cellule

- Il concentrato del reagente IQ Products *Intra-Cell*<sup>™</sup> deve essere tenuto a temperatura ambiente (20-25 °C) e miscelato bene prima della diluizione per evitare precipitati solidi.
- Preparare una soluzione "di lavoro" con diluizione 1:10 dal concentrato del reagente *Intra-Cell*<sup>™</sup>; per esempio:
  - Concentrato di IQ Products *Intra-Cell*<sup>™</sup> 5 ml
  - Acqua (H<sub>2</sub>O) per la preparazione di reagenti 45 ml
- Miscelare bene e conservare la soluzione "**di lavoro**" (IQ Products *Intra-Cell*<sup>™</sup> diluito 1:10) in frigorifero (2-8 °C).
- Scadenza: la soluzione "di lavoro" scade dopo 30 giorni o quando si manifestano problemi di torbidità. La soluzione madre può essere utilizzata fino alla scadenza indicata sull'etichetta.

### Campione

Campioni di sangue intero EDTA o altri campioni anticoagulati

- Refrigerare il campione se il test non viene eseguito entro 4 ore dal prelievo.
- È possibile tenere i campioni refrigerati per 72 ore prima dell'esecuzione del test [1].

### Preparazione dei campioni

- 1 Preparare una diluizione 1:20 di FETALtrol<sup>™</sup> o di sangue EDTA anticoagulato utilizzando PBS con 0,5% di BSA o di soluzione "di lavoro" Tampone FMH QuikQuant<sup>™</sup>.
- 2 Versare 10 µl di cellule diluite in una provetta di plastica al polistirene 12 X 75 mm.
- 3 Aggiungere nella provetta 0,75 ml di glutaraldeide (glutaraldeide allo 0,03% in PBS **senza** BSA).
- 4 Miscelare con vortex subito dopo l'aggiunta di glutaraldeide alle cellule e poi in modo intermittente durante l'incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Evitare l'aggregazione di globuli rossi facendo in modo che le cellule rimangano in sospensione durante questa fase di fissaggio.
- 5 Aggiungere in ogni provetta 1,5 ml di soluzione "di lavoro" di IQ Products *Intra-Cell*<sup>™</sup> e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
- 6 Miscelare con vortex subito dopo l'aggiunta della soluzione di *Intra-Cell*<sup>™</sup> e almeno due volte durante l'incubazione, evitando l'aggregazione di cellule.

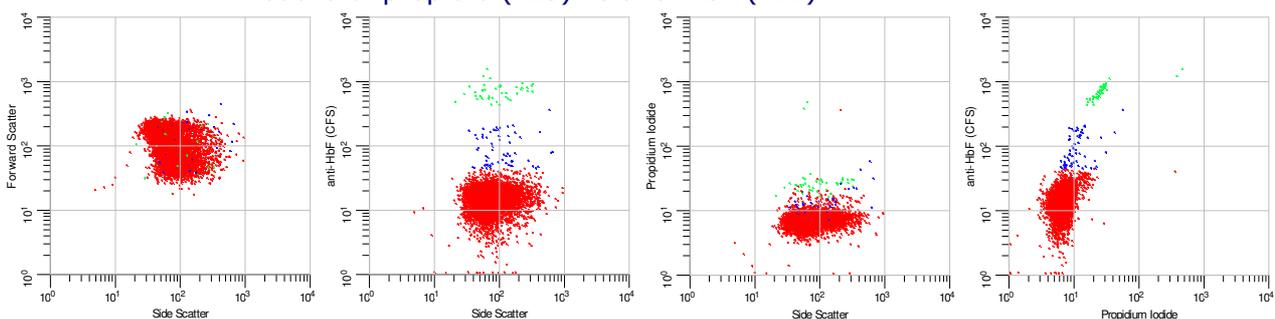
- 7 Centrifugare per 60 secondi con il lavatore cellulare e lasciar decantare per 5 secondi. In alternativa, centrifugare a 600 x g per almeno 5 minuti in una centrifuga e poi lasciar decantare il supernatante.
- 8 Per disperdere completamente il precipitato, miscelare il contenuto della provetta con vortex per almeno 15 secondi.
- 9 Aggiungere 10 µl di Reagente anticorpo IQ Products FMH QuikQuant™, seguito da 40 µl di soluzione "di lavoro" di Tampone FMH QuikQuant™.
- 10 Incubare per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.
- 11 Aggiungere 2,0 ml di soluzione "di lavoro" di Tampone FMH QuikQuant™, miscelare con vortex e incubare a temperatura ambiente per 30 secondi. **Nota - Per facilitare la miscelazione senza versamenti, suggeriamo di aggiungere prima solo 1 ml, di mescolare delicatamente con vortex, di aggiungere l'altro 1 ml e infine di rimescolare.**
- 12 Centrifugare per 60 secondi con il lavatore cellulare e lasciar decantare per 5 secondi. In alternativa, centrifugare a 600 x g per almeno 5 minuti in una centrifuga e poi lasciar decantare il supernatante.
- 13 Aggiungere 1,0 ml di soluzione "di lavoro" di Tampone FMH QuikQuant™, mescolare accuratamente il contenuto della provetta ed evitare l'esposizione alla luce. Analizzare le cellule nel citometro a flusso, raccogliendo per l'analisi almeno 100.000 globuli rossi.

### Preparazione del citometro a flusso

- 1 Selezionare 2 campioni di sangue, uno di sangue adulto con alta conta leucocitaria e l'altro di sangue adulto arricchito con cellule del cordone ombelicale ABO-compatibili sottoposte a lavaggio o di FETALtro™ livello 3. (Gli eritrociti devono essere lavati due volte e rimessi in sospensione in PBS/BSA prima della miscelazione o dell'arricchimento per eliminare completamente le emoagglutinine che possono causare l'aggregazione di eritrociti.)
- 2 Colorare secondo la prassi di colorazione delle analisi FMH QuikQuant™.
- 3 Per preparare il protocollo del citometro, osservare i seguenti passaggi:

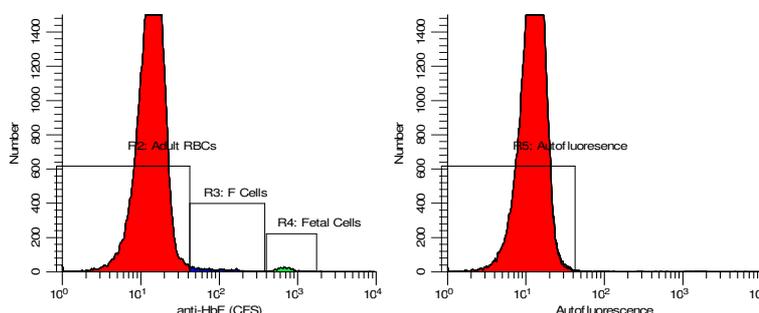
#### a) Tracciare quanto segue: **Istogrammi biparametrici:**

- FSC vs SSC (log-log)
- Anti-HbF (FL1) vs SSC-log
- Ioduro di propidio (FL3) vs SSC-log
- Ioduro di propidio (FL3) vs anti-HbF (FL1)



#### **Istogramma (o istogrammi) monoparametrico,**

- Numero vs anti-HbF (FL1)
- Numero vs Autofluorescenza (FL2) (opzionale)



E un **Riquadro risultati** con l'indicazione di eventi RBC "gated", di RBC adulte, di cellule F adulte e di RBC fetali (autofluorescenza e cellule nucleate sono opzionali)

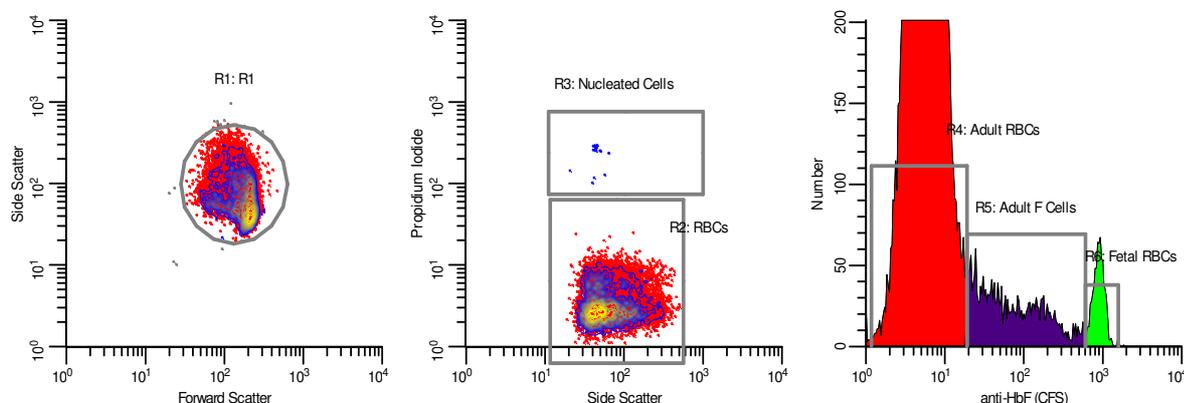
Id1: QQ_FMH-034_B.14.001				
Id2: 19Jan2009				
	Alias	Region	%Gate	MedianX
R1	RBC Gate	49905	99.81	
R2	Adult RBCs	48987	97.97	13.82
R3	F Cells	616	1.23	74.59
R4	Fetal Cells	391	0.78	684.98
R5	Autofluorescence	49897	99.79	12.51
R6	Nucleated cells	35	0.07	64.47

- b) Durante l'analisi della provetta contenente la **miscela colorata di sangue adulto/cordone ombelicale** (o di **FETALtrol™ livello 3**), regolare l'FS-log e l'SS-log in modo che la popolazione di RBC si trovi a metà scala su entrambi gli assi.
- c) Regolare la soglia su FS per eliminare gli eventi indesiderati (piastrine, detriti cellulari), che hanno un segnale inferiore a quello della popolazione di eritrociti.
- d) Regolare FL1 (anti-HbF) e FL3 (ioduro di propidio) in modo che la popolazione di eritrociti si trovi nei primi dieci valori di entrambi i parametri e che l'intero picco sia visualizzabile negli istogrammi. Sebbene PI sia un marker specifico per cellule nucleate, è possibile servirsi dell'autofluorescenza per fissare zone quando si contano le cellule F [22].
- e) Durante l'analisi della provetta contenente il **campione colorato con alta conta leucocitaria**, regolare la compensazione FL3 – FL1 in modo che gli eritrociti (colorati) lungo l'asse FL1 cadano per lo più nei primi dieci valori dell'asse FL3, senza però avere > 1% di eritrociti alla linea basale del segnale FL1.
- f) Posizionare una zona di gating intorno agli eritrociti, **escludendo aggregati cellulari**, detriti cellulari e cellule nucleate (eventi positivi allo ioduro di propidio). Accertarsi che l'istogramma monoparametrico sia basato su questo gate (G1 = R1). Fissare zone di analisi per eritrociti adulti, cellule F adulte ed *eritrociti fetali (per istruzioni su come regolare tali zone, vedere più avanti) sull'istogramma monoparametrico del parametro anti-HbF.*
- g) *Nominare e salvare le impostazioni dello strumento e il modello di protocollo con il protocollo di acquisizione impostato anch'esso sulla raccolta di almeno 50.000 eventi in un file listmode con tutti i parametri (FS, SS, FL1, FL2 e FL3).*

### Analisi di file listmode

L'analisi di file listmode deve essere eseguita come illustrato nei precedenti istogrammi. Utilizzare una zona di gating per escludere le cellule nucleate dall'analisi, che si consiglia di rappresentare come istogramma di Rifrazione laterale vs Ioduro di propidio. Ulteriori strategie di gating devono includere un meccanismo di esclusione degli aggregati di eritrociti dall'analisi mediante un gate di Rifrazione frontale (FALS) vs Rifrazione laterale. Un'eccessiva quantità di aggregati di eritrociti (> 1%) può portare a una significativa sopravvalutazione della percentuale di eritrociti fetali poiché gli aggregati causano una sottovalutazione del vero denominatore. Come illustrato in precedenza, si consiglia anche di creare zone di analisi nell'istogramma monoparametrico dell'anti-HbF utilizzando tre zone corrispondenti rispettivamente a RBC adulte, cellule F adulte e RBC fetali. La disattivazione dell'eventuale funzione di scalatura automatica nel software di analisi consente una migliore visualizzazione della popolazione di RBC fetali. In alternativa, anche i diagrammi biparametrici di anti-HbF vs Autofluorescenza possono essere un mezzo efficace per la definizione della zona di identificazione di RBC fetali. Non è ancora stato stabilito un metodo consensuale di determinazione delle zone per RBC adulte e cellule F adulte, anche se noi abbiamo proposto una soluzione basata sul segnale di autofluorescenza.

La regione di analisi di RBC fetali deve essere determinata innanzitutto avvalendosi dei campioni di controllo per fissare la zona di analisi all'uno e all'altro lato del picco di RBC fetali sul campione di controllo di alto livello (normalmente 1-2% di RBC fetali).



**Figura 1. L'analisi dei dati deve prevedere il gating per escludere aggregati RBC (gate R1) e cellule nucleate (gate R2), quindi il conteggio di RBC adulte (zona R5), di cellule F adulte (zona R6), volendo, e di RBC fetali (zona R7).**

### Controllo di qualità del test

È indispensabile che i campioni di controllo multilivello analizzati servano per valutare sia la procedura che l'analisi. Una bassa intensità di colorazione, danni alle cellule dovuti a un'errata concentrazione delle soluzioni di fissazione e/o di permeabilizzazione, livelli maggiori di cellule F e un'inadeguata compensazione nonché un gating non ottimale possono incidere notevolmente sulla validità dei risultati. Due sono le principali fonti di campioni di Controllo Qualità:

**FETALtrol™** - Il prodotto di controllo del sangue stabilizzato è una comoda alternativa ai controlli di preparazione propria. Contiene fiale di controlli negativi e positivi di basso livello (~0,15% di RBC fetali) e di alto livello (~1.5% di RBC fetali) e ha una durata di 3 mesi. Il prodotto funge esattamente da sangue intero in questa procedura ed è approvato dall'FDA statunitense come controllo per diagnostica in vitro.

**Campioni di sangue arricchito preparati in proprio** – miscele di sangue fetale o del cordone ombelicale di gruppo ABO con sangue adulto. La soluzione ideale sarebbe la disponibilità di controlli di alto livello, di basso livello e negativi con valori convalidati per RBC fetali.

### Manipolazione e conservazione

Quando non vengono utilizzate, conservare le fiale di Reagente anticorpo FMHQuikQuant™ in posizione verticale, ben chiuse e a una temperatura di 2-8 °C. Conservare il concentrato **Intra-Cell™** in posizione verticale, ben chiuso, **a temperatura ambiente**. Evitare cicli superflui di riscaldamento e di raffreddamento di tutti i reagenti. Proteggere il prodotto da congelamento, da temperature superiori a 30°C e dall'esposizione prolungata a temperatura ambiente (18-25°C), salvo il concentrato **Intra-Cell™**, o dall'esposizione alla luce. Conservare il concentrato di Tampone FMHQuikQuant™ in posizione verticale e a temperatura ambiente (18-25 °C).

### Avvertenza

Il Reagente anticorpo IQ Products FMHQuikQuant™ e il concentrato Tampone FMHQuikQuant™ contengono sodio azide (< 0,1% peso/volume). Se combinata con acidi o metalli, la sodio azide è un composto tossico e pericoloso. Maneggiare con prudenza. Le soluzioni contenenti sodio azide devono essere smaltite correttamente.

### Controllo della qualità del prodotto

Prestazioni e specificità dei reagenti contenuti in questo kit sono valutate con metodi di controllo qualità interni di IQ Products. Il processo di fabbricazione adotta criteri del sistema di qualità e di produzione conformi alle norme FDA QSR e EN ISO 13485.

### Limitazioni del prodotto

Le seguenti condizioni cliniche possono portare a un maggiore livello di HbF a causa dei livelli più elevati di cellule F adulte e non devono essere confuse con un'emorragia fetomaterna [22-24]:

- Anemia grave
- Persistenza ereditaria di HbF
- Talassemia
- Anemia falciforme, specialmente sotto terapia con idrossiurea, butirrato o altri farmaci che aumentano il livello di HbF

### Possibili problematiche

- Colorazione inadeguata e separazione scadente sono normalmente il risultato di una fissazione e/o permeabilizzazione erranea. La glutaraldeide deve essere conservata correttamente e diluita immediatamente prima dell'uso in fase di fissazione. Le cellule non adeguatamente fissate dalla glutaraldeide subiscono lisi quando viene aggiunta la soluzione di **Intra-Cell™**. Se la fase con **Intra-Cell™** non viene eseguita correttamente, l'anticorpo coniugato di HbF non è in grado di raggiungere il suo target all'interno della cellula [23].
- La preparazione dello strumento o i parametri di compensazione non sono ottimizzati.
- Mancata utilizzazione di una zona per la definizione delle cellule fetali in base a controlli positivi come FETALtrol™.
- La miscelazione inadeguata della glutaraldeide e/o l'impiego di una concentrazione più forte del dovuto possono causare aggregati, circostanza spesso rivelata dalla presenza di agglutinazione cellulare e di valori più alti del previsto per i campioni di FETALtrol.
- La mancata diluizione del concentrato 10X di soluzione di permeabilizzazione IQ Products **Intra-Cell™** provoca aggregazione o agglutinazione (simile per aspetto ad agglutinine fredde o a rouleaux), che incide negativamente sulla precisione dei valori ottenuti.
- Soluzioni non filtrate possono contenere microparticelle che lo strumento 'vedrebbe' e conterebbe. Ciò potrebbe ridurre il numero di eventi (RBC) utili nel conteggio totale e rendere difficile l'analisi o incidere negativamente sulla precisione dei valori ottenuti.
- I campioni post-trasfusione con aggregati cellulari mediati immunologicamente possono dare valori cellulari fetali falsamente alti. Il problema può essere evitato escludendo gli aggregati.
- La mancata esclusione di cellule nucleate autofluorescenti durante l'analisi dei dati può dare un erroneo aumento del livello di eritrociti fetali.

### Valori previsti e derivazioni

Ogni laboratorio deve stabilire una propria gamma di riferimento accettabile per l'analisi dell'emorragia fetomaterna. La media di laboratorio dei risultati di RBC fetali prevista per campioni ematici di pazienti sane e non in stato di gravidanza è  $\leq 0,06\%$ . I livelli di cellule F adulte sono valori generalmente non riportati, ma

la pubblicistica suggerisce che per la maggior parte dei campioni sarebbe  $< 5\%$  [24-26]. Donatrici di laboratorio normali e apparentemente sane sono state studiate in tre centri. Questi risultati vanno intesi solo come indicazioni di riferimento. Ogni laboratorio deve stabilire le proprie gamme di riferimento.

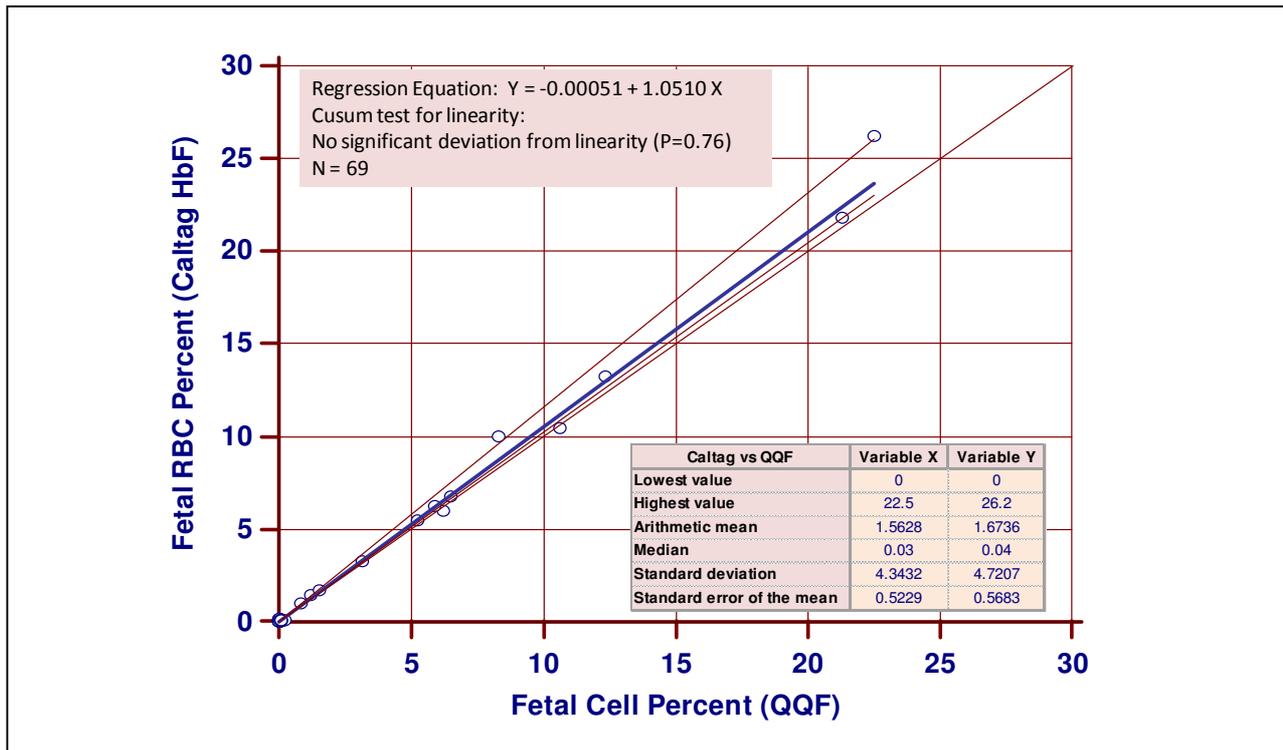
## Caratteristiche delle prestazioni

<b>FMHQuikQuant™ - Versione per citometria a flusso – Studio di sensibilità</b>						
RBC fetali previsti (%)	Replica 1	Replica 2	Media	Dev St	CV	Valore P
0,00	0,01	0,02	0,02	0,01	33,3%	1,00000
0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,0%	0,42265
0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	0,0%	0,03775
0,07	0,06	0,07	0,07	0,01	7,7%	0,01942
0,10	0,12	0,09	0,11	0,02	14,3%	0,02951
0,15	0,14	0,15	0,15	0,00	3,5%	0,00295
0,17	0,19	0,18	0,19	0,01	2,7%	0,00173
0,18	0,13	0,19	0,16	0,03	18,8%	0,04129
0,37	0,34	0,39	0,37	0,03	6,9%	0,00526
0,64	0,58	0,57	0,58	0,01	0,9%	0,00016
0,92	0,83	0,81	0,82	0,01	1,2%	0,00019
1,19	1,19	1,08	1,14	0,05	4,9%	0,00242
1,46	1,33	1,50	1,42	0,09	6,0%	0,00368
1,65	1,51	1,74	1,63	0,12	7,1%	0,00507
1,83	1,90	1,80	1,85	0,05	2,7%	0,00075

**Tabella 1** - La determinazione della sensibilità del test è stata eseguita mediante studi sulla diluizione di miscele di IQ Products FETALtrol™ (livelli alto, basso e controllo negativo), seguiti da misurazioni ripetute su un citofluorimetro FACScan Becton Dickinson. Come mostra la tabella, campioni con un livello di eritrociti fetali basso come lo 0,04% possono essere distinti chiaramente ( $P < 0,05$ ) da campioni privi di cellule fetali.

<b>FMHQuikQuant™ -su FACScan- Studio di precisione</b>					
Replica	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
1	0,02	0,17	0,68	0,76	1,72
2	0,02	0,16	0,75	0,79	1,70
3	0,01	0,17	0,70	0,78	1,71
4	0,02	0,16	0,68	0,82	1,69
5	0,01	0,17	0,70	0,94	1,69
6	0,01	0,18	0,71	0,80	1,75
Media	0,02	0,17	0,70	0,80	1,71
Dev St	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
CV	33,3%	4,1%	3,4%	3,3%	1,2%

**Tabella 2** - La determinazione dell'imprecisione dell'analisi è stata eseguita mediante studi su miscele di IQ Products FETALtrol™ seguiti da misurazioni di repliche su citofluorimetro FACScan Becton Dickinson. Come mostra la tabella, campioni con un livello di eritrociti fetali basso come lo 0,17% hanno un coefficiente di variazione  $< 5\%$ .



**Figura 2.** La determinazione della linearità dell'analisi è stata eseguita mediante la regressione di Passing e Bablok tra la percentuale di RBC fetali misurata con il metodo di citometria a flusso Caltag dell'HgB e le analisi FMH QuikQuant (QQF).

### Situazione normativa

In questo momento, la FMH QuikQuant™ è registrato come "dispositivo medico diagnostico in vitro" nei paesi appartenenti alla Comunità Europea. In tutti gli altri paesi dovrebbe essere etichettato come "per uso diagnostico in vitro".

### Rimandi

- 1 CLSI, *Fetal Red Cell Detection; Approved Guideline*. CLSI (formerly NCCLS) Document H52-A, 2001.
- 2 Davis, BH. *Diagnostic Advances in Defining Erythropoietic Abnormalities and Red Cell Diseases*. Seminars in Hematology, 2001; **38**:148-59.
- 3 Davis, B.H. Diagnostic utility of red cell flow cytometric analysis. Clin Lab Med 2001; **21**(4):829-40.
- 4 Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal haemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. Transfusion 1990; **30**:344-57.
- 5 Giacoia G.P. Severe fetomaternal hemorrhage: a review. Obstet & Gynecol Surv, 1997; **52**(6): p. 372-80.
- 6 Polesky, HF, Sebring ES, Evaluation of methods for detection and quantitation of fetal cells and their effect on RhIgG. American Journal of Clin Path, 1981; **76**:525-29.
- 7 Hartwell, EA. Use of Rh immune globulin: ASCP practice parameter. American Journal of Clin Path, 1998; **110**:281-92.
- 8 Lee D, Contreras M, Robson SC, et al. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. Transfusion Med 1999; **9**:93-7.
- 9 Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear. Klin Wochenschr 1957; **35**:637-38.
- 10 Duckett JR, Constantine G. The Kleihauer technique: an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? British Journal of Obstet & Gynaecol 1997; **104**: 845-6.
- 11 Emery CL, Morway LF, et al. The Kleihauer-Betke test. Clinical utility, indication, and correlation in patients with placental abruption and cocaine use. Arch Pathol Lab Med 1995; **119**(11):1032-7.

- 12 Davis BH, Olsen S, et al. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion* 1998;38(8):749-56.
- 13 Chen JC, Davis BH, et al. Multicenter clinical experience with flow cytometric method for fetomaternal hemorrhage detection. *Cytometry* 2002;50(6):285-90.
- 14 Lloyd-Evans P, Kumpel BM et al. Use of a directly conjugated monoclonal anti-D (BRAD-3) for quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Transfusion* 1996;36(5):432-7.
- 15 Nance SJ, Nelson JM, et al. Quantitation of fetal-maternal hemorrhage by flow cytometry. A simple and accurate method. *Am J Clin Pathol*, 1989;91(3): 288-92.
- 16 Navenot JM, Merghoub T et al. New method for quantitative determination of fetal hemoglobin-containing red blood cells by flow cytometry: application to sickle-cell disease. *Cytometry* 1998;32(3):186-90.
- 17 Nelson M, Zarkos K et al. A flow-cytometric equivalent of the Kleihauer test. *Vox Sanguinis* 1998;75:234-41.
- 18 Navenot JM, Muller JY, et al. Expression of blood group i antigen and fetal hemoglobin in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 1997;37(3):291-7.
- 19 Munde Y, Bigelow NC, et al. Simplified flow cytometric method for fetal hemoglobin containing red blood cells. *Cytometry* 2000;42(6):389-393.
- 20 Bromilow, IM, Duguid JK. Measurement of feto-maternal haemorrhage: a comparative study of three Kleihauer techniques and two flow cytometry methods. *Clin & Lab Haematol*, 1997;19(2):137-42.
- 21 Chen J, Bigelow N, et al. Proposed flow cytometric reference method for the determination of erythroid F-cell counts. *Cytometry* 2000;42(4):239-46.
- 22 Davis, BH, Davis, KT. Laboratory assessment of fetomaternal hemorrhage is improved using flow cytometry. *Lab Med* 2007;38:365-73.
- 23 Garner C, Tatu T, Reittie JE et al. Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood* 2000;95: 342-46.
- 24 Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, et al., Fetal hemoglobin and F-cell responses to long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *Blood* 1998;91(12):4472-9.
- 25 Thein SL, Craig JE. Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin* 1998;22(5-6):401-14.
- 26 EN ISO 15223-1 Medical devices – Symbols to be used with medical device labels, labeling and information to be supplied-Part 1: General requirements.

## Garanzia

La sola garanzia offerta è di conformità a quantità e contenuti indicati sull'etichetta al momento della fornitura al cliente. Non vengono concessi altri tipi di garanzia, espressi o impliciti, che esulino dalla descrizione riportata sull'etichetta del prodotto. IQ Products bv non sarà responsabile di danni alla proprietà, ferite personali o perdite economiche causate dal prodotto.

## Legenda dei simboli

	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Sufficiente per
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Attenzione, consultare il documento allegato
	Conservare al riparo dalla luce (solare)
	Rischio biologico
	Limiti di temperatura (°C)
	Ad esclusivo uso di ricerca
	Codice del lotto
	Utilizzare entro aaaa-mm-gg
	Fabbricante
	Mandatario nella Comunità Europea
	Conformité Européenne (Conformità Europea)

**Assistenza clienti**

**IQ Products bv**

Rozenburglaan 13a

9727 DL Groningen

Paesi Bassi

Telefono +31(0) 50 57 57 000

Fax +31(0) 50 57 57 002

Assistenza tecnica: [marketing@iqproducts.nl](mailto:marketing@iqproducts.nl)

Ordini: [orders@iqproducts.nl](mailto:orders@iqproducts.nl)

[www.iqproducts.nl](http://www.iqproducts.nl)