



FMH QuikQuant™

Rapid Assay for Fetomaternal Hemorrhage Quantification

REF²⁶ QQF-100 IVD CE

▽ 100 tests ⓘ package insert

Basic UDI-DI: 87179530223QQF-100N8

Barcode GS1 (GTIN): 8719327450901

INTERNATIONAL PACKAGE INSERT

Português		3
Español		11
Suomalainen		19

FMH QuikQuant™**Teste Rápido para Quantificação de Hemorragia Feto-materna**

 QQF-100  
 100 testes  bula

Uso Previsto

O FMH QuikQuant™ kit destina-se à identificação e detecção quantitativa de glóbulos vermelhos fetais humanos no sangue materno. Este método usado para o diagnóstico de Hemorragia Fetomaternal (FMH) é aplicado a amostras de sangue periférico de mulheres grávidas com trauma abdominal e / ou suspeita de incompatibilidade Rhesus D (RhD). O FMH QuikQuant™ é baseado num método de citometria de fluxo não automatizado, sensível e preciso, que oferece uma detecção fluorescente do antígeno intracelular, hemoglobina fetal (HbF). A HbF é detectada em glóbulos vermelhos obtidos de sangue total periférico humano tratado com EDTA ou com heparina. O FMH QuikQuant™ destina-se ao uso em laboratórios hospitalares e de referência por técnicos médicos treinados ou indivíduos semelhantes com experiência em métodos de teste para FMH e citometria de fluxo.

Resumo e Princípio

A utilização mais importante da detecção de glóbulos vermelhos (GV) fetais é a avaliação da hemorragia feto-materna (HFM) [1-4]. A HFM ocorre normalmente ao longo da gravidez em quantidades mínimas, com volumes crescentes durante as últimas fases da gestação [5]. Se houver uma diferença significativa na antigenicidade eritrocitária entre o feto e a mãe, isto pode resultar na alossensibilização do sistema imunitário materno, seja antes ou depois do parto. Os anticorpos maternos para os antígenos eritrocitários fetais podem ser clinicamente silenciosos ou causar sequelas autoimunes potencialmente letais na atual ou em futuras gravidezes (ex.º: eritroblastose fetal ou aborto precoce). Tal sensibilização pode ocorrer com qualquer incompatibilidade de antígeno eritrocitário, mas a maior frequência e as consequências clínicas mais profundas ocorrem com incompatibilidades do antígeno D ou Rh. A detecção e enumeração dos GV fetais é uma parte essencial da gestão das pacientes com HFM tratadas com preparados de imunoglobina Rh (RhIG) [6]. A profilaxia com imunoglobina Rh é uma prática universal, mas as dosagens e os calendários têm variações regionais [7,8]. Por conseguinte, a sensibilidade e a especificidade dos testes de detecção da HFM é um fator crítico na eficácia terapêutica e no subsequente resultado clínico.

O teste mais utilizado para detecção de HFM tem sido a contagem visual ao microscópio, ou método de Kleihauer-Betke (KB), que se baseia em diferenças nas propriedades de solubilidade em condições ácidas entre a hemoglobina fetal (HbF) e a hemoglobina do adulto [9]. Embora o método KB seja facilmente realizado na maioria dos laboratórios clínicos, tem pouca sensibilidade e apresenta fraca reprodutibilidade ou precisão (CV de 50-100%) [10,11]. Os métodos de citometria de fluxo foram desenvolvidos utilizando as diferenças antigénicas ou avaliação quantitativa da hemoglobina fetal (HbF) para distinguir os GV fetais dos GV do adulto. Estes métodos são mais precisos e menos subjetivos [12-22]. Não obstante, muitos laboratórios continuaram a usar o método KB devido à limitada disponibilidade da citometria de fluxo.

O IQ Products FMH QuikQuant™ é um método de citometria de fluxo para detecção e quantificação de HFM. O teste usa um anticorpo monoclonal anti-hemoglobina F e iodeto de propídio como reagente numa técnica sem lavagem que demora cerca de 45 minutos a estar concluída. Exigindo menos de 15 minutos de tempo do técnico de laboratório, é simultaneamente mais eficiente do que o teste KB e mais sensível e preciso.

Aplicação

A determinação laboratorial do nível de células fetais na circulação materna continua a ser um elemento importante na gestão obstétrica de mulheres com suspeita de trauma uterino e na administração da dosagem correta de imunoglobina Rh.

Componentes do Produto

- 1,0 mL de IQ Products FMH QuikQuant™ antibody reagent para Citometria de Fluxo (100 testes)
- 40 mL de IQ Products *Intra-Cell™* Solução de permeabilização – fornecida como 10X concentrado contém 1.0% de Triton-X 100  **AVISO**
- 40 mL de IQ Products FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate – fornecida como 10X concentrado

Reagentes e Materiais Necessários, mas não incluídos

- Tubos de poliestireno de 12 x 75 mm descartáveis com suporte
- Pontas de pipeta, (1-200 µL, 200-1000 µL)
- Pipetas de volume ajustável (0-200 µL e 200-1000 µL)
- Tampão fosfato salino (PBS) ou PBS de Dulbecco Sigma #P3813 ou CellGro #21-031-CM
- Glutaraldeído (0,03% ± 0,015%)
 - Glutaraldeído a 8% para diluição Sigma #G7526 ou Polysciences #00216A
 - OU**
 - Glutaraldeído a 25% para diluição Sigma #G5882 ou Polysciences #01909
- Água de grau reagente, de preferência filtrada
- Filtro de vácuo de 0,2 µm (opcional, mas recomendado)
- FETALtrol™ (IQ Products) ou sangue do cordão umbilical para 3 níveis de controlo em testes de hemorragia feto-materna
- Agitador tipo Vortex
- Centrífuga para lavagem de células do banco de sangue com capacidade para alcançar as 600 x g.
- Citómetro de fluxo multiparamétrico, com capacidade para pelo menos 3 parâmetros de fluorescência
- Software para análise de ficheiros list-mode em formato FCS

Preparação do Reagente

1 PBS

- PBS de Dulbecco 1000 mL CellGro #21-031-CM ou equivalente
- **OU**
- Tampão fosfato salino em pó 1 pacote Sigma #P3813 ou equivalente
- H₂O de grau reagente q.s. 1000 mL
- Misture bem
- Passe por um filtro de vácuo com poro de 0,2 µm, se disponível, para remover partículas de detritos
- Ajuste o pH a 7,4 quando a solução atingir a temperatura ambiente (20-25 °C)
- Guarde no frigorífico a 2-8 °C
- A validade deve ser determinada por procedimento laboratorial padrão. A utilização de água estéril/filtrada como diluente alargará o prazo de validade para 30 dias a 2-8 °C.

2 FMH QuikQuant™ buffer working solution – equivalente a PBS com BSA (0,5%)

- H₂O de grau reagente 9 partes
- FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate 1 parte
- **Por exemplo: 9 mL de H₂O e 1 mL de concentrado IQ Products BSA combinados**
- Misture bem
- Passe por um filtro de vácuo com poro de 0,2 µm, se disponível, para remover partículas de detritos
- Ajuste o pH a 7,4 quando a solução atingir a temperatura ambiente (20-25 °C)
- Guarde no frigorífico a 2-8 °C
- Validade: deve ser determinada por procedimento laboratorial padrão. A utilização de água estéril/filtrada como diluente alargará o prazo de validade para 30 dias a 2-8 °C.

3 Diluição de trabalho de glutaraldeído: 0,03%

Nota: uma vez que a pureza do glutaraldeído pode variar consoante o fabricante ou os lotes, as concentrações de glutaraldeído entre 0,015 – 0,045% devem ser avaliadas para otimização da separação da coloração de GV fetais e do adulto com o teste (separação de 2 log ou mais desejável).

Guarde o glutaraldeído de **reserva** no congelador (as ampolas podem ser divididas em alíquotas para microtubos de polipropileno e novamente congeladas) ou no frigorífico de acordo com as recomendações do fabricante. Faça uma solução de trabalho fresca em cada dia de utilização

- Solução de reserva de glutaraldeído Grau EM ou Grau I a **8%** 94 uL Sigma #G7526 ou Polysciences #00216A
- PBS (pH 7,4) 25 mL (ver PBS acima)
- **OU**
- Solução de reserva de glutaraldeído Grau EM ou Grau I a **25%** 30 uL Sigma #G5882 ou Polysciences #01909
- PBS (pH 7,4) 25 mL (ver PBS acima)
- Misture bem e mantenha no frigorífico (2-8 °C) durante o máximo de 2 horas antes da utilização
- Validade: elimine o glutaraldeído diluído não utilizado / Consulte no recipiente do fabricante a validade do glutaraldeído de reserva.

4 IQ Products Intra-Cell™ para permeabilização celular

- IQ Products Intra-Cell™ Concentrado de reagente deve ser mantido à temperatura ambiente (20-25 °C) e bem misturado antes da diluição para evitar a precipitação de sólidos
- Prepare uma solução de trabalho com uma diluição 1:10 a partir de Intra-Cell™ Concentrado de reagente, por exemplo:
 - IQ Products Intra-Cell™ Concentrado 5 mL
 - Água (H₂O) de grau reagente 45 mL
- Misture bem e guarde a solução de **trabalho** (IQ Products Intra-Cell™ com diluição 1:10) no frigorífico (2-8 °C).
- Validade: a solução de trabalho perde a validade após 30 dias ou mediante a deteção de qualquer turvação na solução. A solução de reserva pode ser usada até à data de validade indicada na etiqueta.

Amostra

Sangue total com EDTA ou outras amostras anticoaguladas

- Coloque a amostra no frigorífico se o teste não for realizado no prazo de 4 horas após a colheita.
- As amostras podem ser mantidas no frigorífico durante 72 horas antes do teste [1].

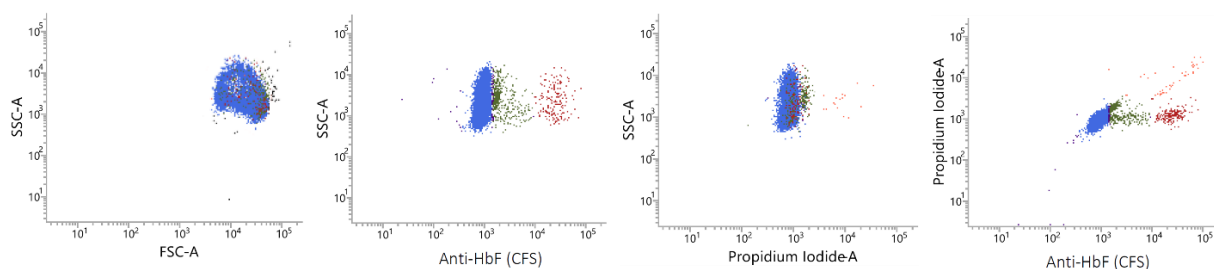
Preparação da Amostra

- 1 Prepare uma diluição 1:20 de sangue com FETALtrol™ ou anticoagulante EDTA utilizando PBS com BSA a 0,5 % ou FMH QuikQuant™ buffer working solution.
- 2 Coloque 10 µL de células diluídas dentro de um tubo de poliestireno de 12 X 75 mm.
- 3 Acrescente 0,75 mL de glutaraldeído (glutaraldeído a 0,03 % em PBS **sem** BSA) ao tubo.
- 4 Agite no Vortex após acrescentar o glutaraldeído às células e intermitentemente durante a incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos. Evite a formação de conglomerados de GV garantindo que as células permanecem em suspensão durante esta etapa de fixação.
- 5 Acrescente 1,5 mL de solução de trabalho IQ Products Intra-Cell™ a cada tubo e deixe incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 6 Agite no Vortex após acrescentar a solução Intra-Cell™ e pelo menos duas vezes durante a incubação, minimizando assim os agregados de células.
- 7 Coloque durante 60 segundos na centrífuga para lavagem de células e decante durante 5 segundos. Em alternativa, centrifugue durante pelo menos 5 minutos a 600 xg e, em seguida, decante o sobrenadante.
- 8 Agite o tubo no Vortex durante pelo menos 15 segundos para dispersar totalmente o sedimento.

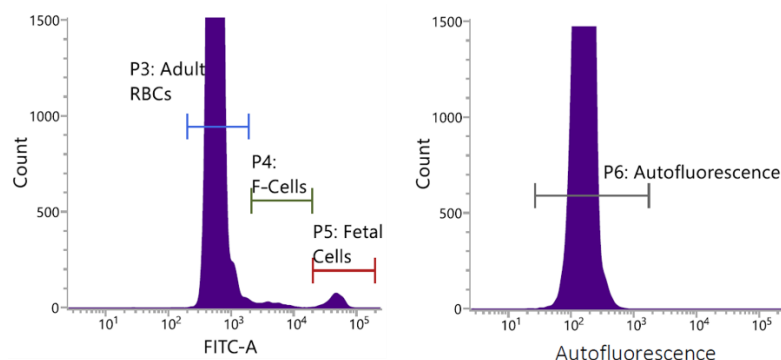
- 9 Acrescente 10 µL de IQ Products FMH QuikQuant™ antibody reagent, seguidos de 40 µL FMH QuikQuant™ buffer working solution.
- 10 Deixe incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
- 11 Acrescente 2,0 mL de FMH QuikQuant™ buffer working solution, agite no Vortex e deixe incubar à temperatura ambiente durante 30 segundos. **Nota: para facilitar a mistura sem derramar, sugerimos que acrescente 1 mL e agite suavemente no Vortex, depois acrescente mais 1 mL e misture novamente.**
- 12 Coloque durante 60 segundos na centrífuga para lavagem de células e decante durante 5 segundos. Em alternativa, centrifugue durante pelo menos 5 minutos a 600 xg e, em seguida, decante o sobrenadante.
- 13 Acrescente 1,0 mL de FMH QuikQuant™ buffer working solution, misture bem no tubo e evite a exposição à luz. Processe no citómetro de fluxo, recolhendo um mínimo de 100.000 GV para análise.

Configuração do Citómetro de Fluxo

- 1 Selecione 2 amostras de sangue, uma de sangue de adulto com uma contagem elevada de glóbulos brancos (GB) e uma de sangue de adulto onde tenha adicionado células lavadas do cordão umbilical compatíveis com ABO ou FETALTrol™ Nível 3. (Todos os glóbulos vermelhos têm de ser lavados duas vezes e novamente suspensos em PBS/BSA antes de serem misturados ou adicionados para remover toda a hemaglutinina que possa causar conglomeração.)
- 2 Siga o procedimento de coloração do teste FMH QuikQuant™.
- 3 Efetue as etapas abaixo para configurar o protocolo de citometria:
 - a) Faça o seguinte:
 - **Histogramas de dois parâmetros:**
 - FSC vs SSC (log-log)
 - Anti-HbF (FL1) vs log SSC
 - Iodeto de propídio (FL3) vs log SSC
 - Anti-HbF (FL1) vs iodeto de propídio (FL3)



- **Histograma(s) de um parâmetro:**
 - Número vs anti-HbF (FL1)
 - Número vs Autofluorescência (FL2) (opcional)



E uma **Caixa de resultados** que mostre na região eventos de GV, GV do adulto, células F do adulto e GV fetais (autofluorescência e células nucleadas são opcionais)

Statistics					
Sample ID (QuikQuant) A4					
Acquisition Date (QuikQuant) 4/1/2021					
Name	Events	% Total	% Parent	% Grandparent	FITC-A Mean
QuikQuant:All Events	100,000	100.00	***	***	1,443
QuikQuant:P1	99,503	99.50	99.50	***	1,399
QuikQuant:P2	99,189	99.19	99.68	99.19	1,234
QuikQuant:P3: Adult RBCs	97,024	97.02	97.82	97.51	612
QuikQuant:P4: F-Cells	881	0.88	0.89	0.89	5,245
QuikQuant:P5: Fetal Cells	1,156	1.16	1.17	1.16	50,257
QuikQuant:P6: Autofluorescence	99,149	99.15	99.96	99.64	1,226

- Enquanto processa o tubo que contém a **mistura corada de sangue de adulto/cordão umbilical** (ou **FETALtrol™ Nível 3**), ajuste o log FS e o log SS de modo a que a população de GV fique a meio da escala em ambos os eixos.
- Ajuste o limiar em FS para eliminar eventos indesejados (plaquetas, detritos de células) que tenham um sinal inferior ao da população de glóbulos vermelhos.
- Ajuste FL1 (anti-HbF) e FL3 (iodeto de propídio) de modo a que a população de glóbulos vermelhos se encontre na primeira década de ambos os parâmetros e que seja possível visualizar a totalidade do pico nos histogramas. Enquanto o IP é um marcador específico para células nucleadas, a Autofluorescência pode ser usada para definir regiões ao enumerar células F [22].
- Enquanto processa o tubo que contém a **amostra corada com contagem elevada de GB**, ajuste a Compensação FL3 – FL1 de modo a que os GV (corados) ao longo do eixo FL1 se encontrem maioritariamente dentro da primeira década do eixo FL3, mas que não tenha > 1% de GV na linha de base do sinal FL1.
- Coloque uma região à volta dos glóbulos vermelhos, **excluindo agregados de GV**, detritos celulares e células nucleadas (eventos positivos ao iodeto de propídio). Certifique-se de que o histograma de um parâmetro se baseia nesta região (G1 = R1). Defina as regiões de análise para GV do adulto, células F do adulto e GV fetais (consulte abaixo o ajuste das regiões) no histograma de um parâmetro do anti-HbF.
- Atribua um nome e guarde as definições do instrumento e o modelo de protocolo com o protocolo de aquisição também definido para recolher pelo menos 100.000 eventos num ficheiro list-mode com todos os parâmetros (FS, SS, FL1, FL2 e FL3).

Análise de Ficheiros List-Mode

A análise de ficheiros list-mode deve ser realizada conforme apresentado nos histogramas acima. Deve ser usada uma região para excluir células nucleadas, que é recomendável que seja um gráfico de dispersão lateral vs. iodeto de propídio. Além disso, as estratégias de região devem incluir um meio de exclusão de agregados de GV da análise, utilizando uma região FSC vs SSC. O excesso de agregados de GV (> 1%) pode causar uma sobrecontagem significativa da percentagem de GV fetais, uma vez que os agregados fazem com que o verdadeiro denominador seja subcontado. Conforme acima indicado, também é recomendável que sejam criadas regiões de análise num gráfico de um parâmetro de anti-HbF utilizando três regiões correspondentes a GV do adulto, células F do adulto e GV fetais. A desativação de qualquer função de escala automática do software de análise permitirá uma melhor visualização da população de GV fetais. Em alternativa, os gráficos de dois parâmetros da expressão de anti-HbF vs. autofluorescência também podem ser um meio eficaz para definir a região de identificação de GV fetais. Ainda não foi estabelecido um método consensual para definição das regiões para GV do adulto e células F do adulto, embora tenhamos proposto uma abordagem utilizando o sinal de Autofluorescência [22]. A região de análise de GV fetais deve ser definida primeiro utilizando as amostras de controlo por forma a definir a região de análise num dos lados do pico de GV fetais na amostra de controlo elevada (tipicamente 1-2% de GV fetais).

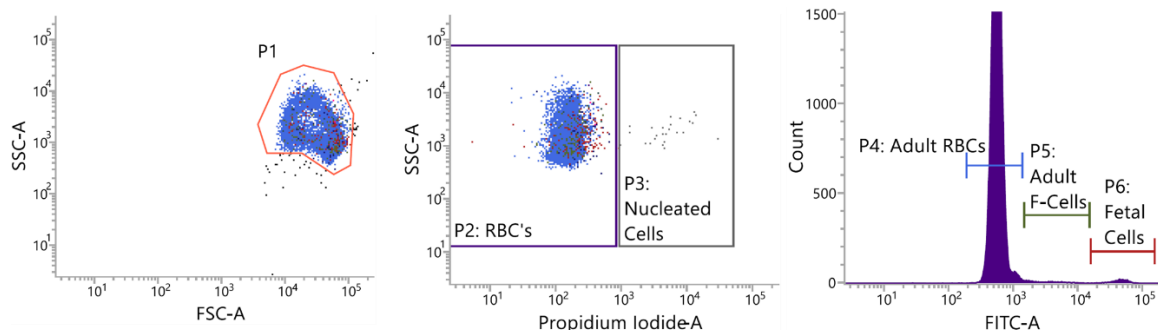


Figura 1. A análise dos dados deve incluir uma região para excluir agregados de GV (gate P1) e células nucleadas (gate P3), depois a enumeração de GV do adulto (região P4), células F do adulto se pretendido (região P5) e GV fetais (região P6).

Controlo da Qualidade do Teste

É imperativo que sejam utilizadas amostras de controlo multinível testadas como forma de avaliar tanto o procedimento como a análise. Uma fraca intensidade de coloração, danos nas células devido a concentração incorreta das soluções de fixação e/ou permeabilização, níveis superiores de células F, bem como uma compensação incorreta e definição de região não ideal podem interferir seriamente com a validade dos resultados gerados. Existem duas fontes principais de amostras para Controlo da Qualidade:

- FETALtrol™** - Produto de controlo sanguíneo estabilizado é uma alternativa prática aos controlos de produção própria. Contém frascos de controlos negativo, positivo baixo (~0,15% de GV fetais) e positivo elevado (~1,5% de GV fetais) e tem uma validade de 3 meses. Este produto é utilizado exatamente como sangue total neste procedimento e foi aprovado pela agência norte-americana FDA como controlo de diagnóstico *in vitro*.
- Produção própria de amostras de sangue com aditivos** – mistura de sangue de adulto com sangue do cordão umbilical ou fetal compatível com ABO. O ideal é que existam controlos positivo elevado, positivo baixo e negativo com valores validados para GV fetais.

Manuseamento e Armazenamento

Guarde os frascos de FMH QuikQuant™ antibody reagent na posição vertical, bem fechados, a 2-8 °C quando não estiverem a ser utilizados. Guarde o *Intra-Cell*™ Concentrado na posição vertical, bem fechado, à temperatura ambiente. Evite ciclos desnecessários de aquecimento e arrefecimento de todos os reagentes. Proteja o produto do congelamento, de temperaturas superiores a 30 °C e de períodos de exposição prolongada à temperatura ambiente (18-25 °C), excluindo o *Intra-Cell*™ Concentrado, ou à luz. Guarde o FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate de tampão na vertical e à temperatura ambiente (18-25 °C). Os reagentes armazenados de acordo com as instruções de armazenamento estabelecidas são estáveis até à data de vencimento indicada no rótulo.

Aviso

O IQ Products FMH QuikQuant™ antibody reagent e o FMH QuikQuant™ buffer solution concentrado de tampão contêm azida de sódio (< 0,1% p/v). Este químico transforma-se num composto tóxico e perigoso quando combinado com ácidos ou metais. Manuseie com cuidado. As soluções que contenham azida de sódio devem ser eliminadas de forma adequada. A solução de permeabilização FMH QuikQuant™ *Intra-Cell*™ contém Triton-X 100, um reagente tóxico que deve ser manuseado de acordo com as boas práticas de laboratório, utilizando as devidas precauções. Evite o contato com a pele e os olhos, bem como a liberação no meio ambiente. Recomenda-se seguir o procedimento interno aconselhado pelo fabricante do citómetro de fluxo após a utilização de iodeto de propídio (PI) na medição. Para obter informações detalhadas, consulte a Folha de Dados de Segurança em: www.iqproducts.nl. Esteja ciente da obrigação dos usuários deste kit de notificar o fabricante e as autoridades designadas sobre incidentes relacionados a este produto.

Controlo da Qualidade do Produto

O desempenho e especificidade dos reagentes incluídos neste kit são testados utilizando os métodos internos de controlo de qualidade da IQ Products. O fabrico deste produto segue as diretrizes de produção e de sistema de qualidade em conformidade com as normas FDA-QMSR e EN ISO 13485:2016.

Limitações do Produto

As situações clínicas que se seguem podem resultar num nível superior de HbF devido a níveis elevados de células F do adulto e não devem ser confundidas com uma Hemorragia Feto-Materna [22-24]:

- Anemia grave
- Persistência hereditária de HbF
- Talassemia
- Doença falciforme, em especial quando submetida a terapia com hidroxiureia, butirato ou outros fármacos que elevam a HbF

Potenciais Problemas

- Uma coloração inadequada e fraca separação são normalmente resultado de uma fixação e/ou permeabilização incorretas. O glutaraldeído deve ser devidamente guardado e diluído apenas antes da utilização na etapa de fixação. Se as células não forem corretamente fixadas com o glutaraldeído, serão lisadas quando o *Intra-Cell*™ for adicionado. Se a etapa do *Intra-Cell*™ não for corretamente efetuada, o anticorpo HbF conjugado não conseguirá alcançar o interior da célula [24].
- Não otimização da configuração do instrumento ou das definições de compensação.
- Não utilização de uma região para definir as células fetais com base num controlo positivo, como o FETALtrol™.
- Uma mistura incorreta e/ou a utilização de glutaraldeído com uma concentração mais forte do que a indicada pode causar agregados, frequentemente detetados pela presença de conglomerados de células e por resultados superiores aos esperados para as amostras com FETALtrol™.
- A incorreta diluição do IQ Products *Intra-Cell*™ 10X Concentrado de solução de permeabilização irá causar conglomeração ou aglutinação (semelhante em aparência macroscópica a aglutininas frias ou *rouleaux*), o que irá afetar negativamente a precisão dos valores obtidos.
- As soluções não filtradas podem conter micropartículas que seriam detetadas e contadas pelo instrumento. Isto pode reduzir o número de eventos (GV) usáveis na contagem total e dificultar a análise ou afetar negativamente a precisão dos valores obtidos.
- As amostras pós-transfusão com agregados celulares mediados imunologicamente pode produzir valores de células fetais falsamente elevados. Este problema pode ser evitado excluindo os agregados.
- A não exclusão de células nucleadas autofluorescentes durante a análise de dados pode dar uma falsa elevação do nível de glóbulos vermelhos fetais.

Valores Esperados e Respetivos Desvios

Cada laboratório deve estabelecer o(s) intervalo(s) de referência aceitáveis para testes de hemorragia feto-materna. A média do laboratório para resultados de GV fetais para amostras de sangue saudáveis de não-grávidas espera-se que seja $\leq 0,06\%$. Os níveis de células F do adulto são geralmente valores não contados, mas as publicações sugerem que a maioria das análises terá < 5% de células F [25]. Foram estudados doadores normais aparentemente saudáveis em três laboratórios. Estes resultados devem servir de orientação. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência.

Características do Desempenho

Os resultados do estudo interno mostraram que o anticorpo dirigido contra o HbF se liga especificamente à hemoglobina fetal e não reconhece a hemoglobina adulta.

Tabela 1. Dados do estudo de sensibilidade FMH QuikQuant™. A determinação da sensibilidade do teste foi realizada através de estudos de diluição de misturas com IQ Products FETALtrol™ (níveis elevado, baixo e negativo) seguidos de medições replicadas num instrumento Becton Dickinson FACScan. Conforme acima apresentado, as amostras com valores tão reduzidos como 0,04% de glóbulos vermelhos fetais foram significativamente distinguidas ($P < 0,05$) das amostras sem células fetais.

% GV fetais esperada	Réplica 1	Réplica 2	Média	Desvio padrão	CV	Valor 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

Tabela 2. Dados de estudo de precisão FMH QuikQuant™. A determinação da imprecisão do teste foi realizada através de estudos de misturas com IQ Products FETALtrol™ seguidos de medições replicadas num instrumento Becton Dickinson FACScan. Conforme acima apresentado, as amostras com valores tão reduzidos como 0,17% de glóbulos vermelhos fetais têm um coeficiente de variação (CV) de $< 5\%$.

Réplica	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 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
Média	0,02	0,17	0,70	0,80	1,71
Des Padr	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
CV	33,3%	4,1%	3,4%	3,3%	1,2%

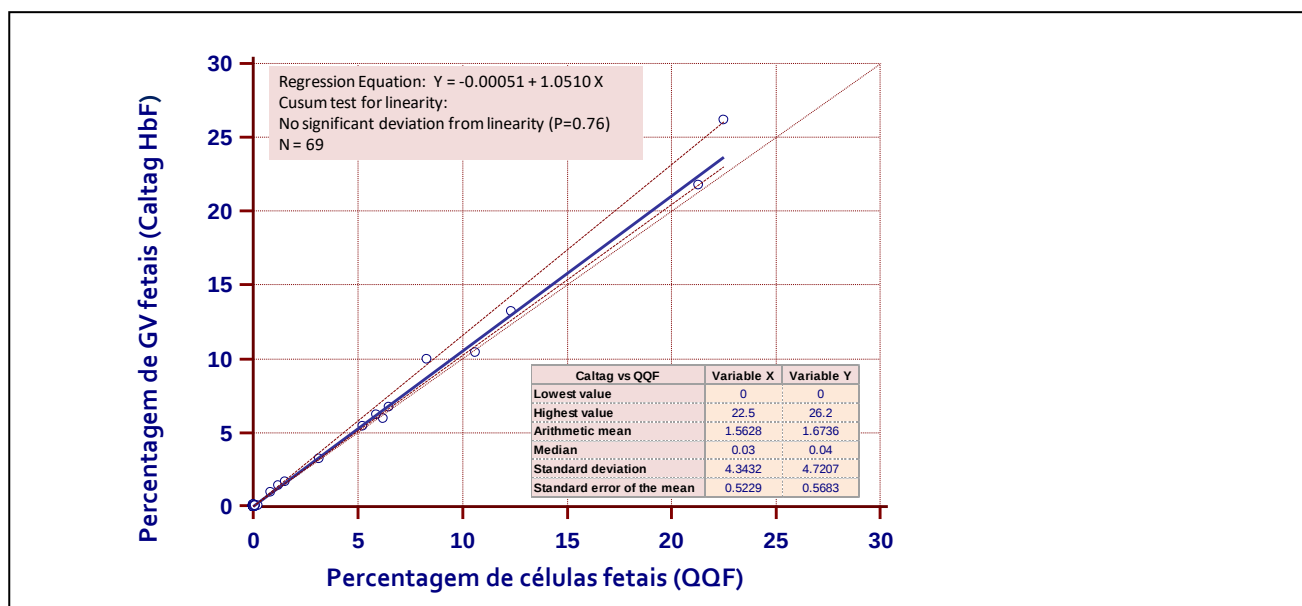


Figura 2. FMH QuikQuant™ não mostra nenhum desvio significativo da linearidade. A determinação da linearidade do teste foi realizada através da regressão de Passing-Bablok entre a percentagem de GV fetais determinada pelos testes de citometria de fluxo Caltag Fetal Hgb e FMH QuikQuant™ (QQF).

Avaliação Clínica:

Os resultados dos testes de 74 e 56 amostras clínicas em dois locais diferentes durante um estudo de avaliação de desempenho, mostraram que a correlação entre o teste Kleihauer Betke e o FMH QuikQuant™ foi excelente ($r^2 = 0,968$ e $r^2 = 0,998$ respectivamente). A literatura confirma esta correlação e afirma que o FMH QuikQuant™ é um método mais preciso, devido à superestimação do FMH pelo KB [27-28]. O histórico dos dados de desempenho clínico pode ser obtido em marketing@iqproducts.nl.

Estatuto Regulamentar

Neste momento, o FMH QuikQuant™ é registrado como "in vitro dispositivo médico de diagnóstico" na Austrália, Suíça, Peru, Reino Unido e nos países que pertencem à Comunidade Europeia. Em todos os outros países, devem ser rotulados "para a pesquisa use only".

Referências

- 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.
- 27 Corcoran D, Murphy D, Donnelly JC, Ainle FN. The prevalence of maternal F cells in a pregnant population and potential overestimation of foeto-maternal haemorrhage as a consequence. *Blood Transfus.* 2014 Oct;12(4):570-4.
- 28 Pastoret C, Le Priol J, Fest T, Roussel Evaluation of FMH QuikQuant for the detection and quantification of fetomaternal hemorrhage. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Jan- Feb;84(1):37-43

Garantia

Os produtos vendidos por esta abrangidos são apenas garantidos conforme a quantidade e conteúdo especificados na etiqueta no momento de entrega ao cliente. Não há garantias, expressas ou implícitas além da descrição na etiqueta do produto. IQ Products BV não se responsabiliza por danos de propriedade, ferimentos pessoais ou perdas económicas causados pelo produto.

Explicação dos símbolos utilizados [26]

	Consulte as instruções de utilização
	Referência de catálogo
	Suficiente para
	Dispositivos médicos de diagnóstico in Vitro
	Atenção, consulte a documentação incluída
	Manter afastado da luz (solar)
	Risco biológico
	Limite de temperatura (°C)
	Pesquisa somente para uso
	Código do lote
	Prazo de validade
	Fabricante
	Representante autorizado na Comunidade Europeia

Apoio ao Consumidor** IQ Products BV**

www.iqproducts.nl
Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen
Holanda

 +31 (0)50 5757000

 Technical: marketing@iqproducts.nl

 Encomendas: orders@iqproducts.nl
www.iqproducts.nl

FMH QuikQuant™

Análisis rápido para cuantificación de hemorragia fetomaternal

REF QQF-100
 100 Pruebas

IVD **CE**
 Prospecto

Utilização Prevista

El FMH QuikQuant™ está diseñado para la discriminación y la detección cuantitativa de glóbulos rojos fetales humanos (fRBC) en la sangre materna. Este método utilizado para el diagnóstico de FMH se aplica a muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas con traumatismo abdominal y/o sospecha de incompatibilidad del factor Rhesus D (RhD). El FMH QuikQuant™ se basa en un método de citometría de flujo no automatizado, sensible y preciso, que ofrece una detección fluorescente del antígeno intracelular, la hemoglobina fetal (HbF). La HbF se detecta en los glóbulos rojos obtenidos de sangre entera periférica humana tratada con heparina o anticoagulada con EDTA. El FMH QuikQuant™ está diseñado para su uso en laboratorios clínicos y de referencia de hospitales por parte de técnicos médicos capacitados o personas similares que tengan experiencia en métodos de prueba para FMH y citometría de flujo.

Resumen y Fundamento

La aplicación más importante de la detección fetal de glóbulos rojos es la evaluación de la hemorragia fetomaternal (FMH) [1-4]. La FMH se produce normalmente en cantidades mínimas durante el embarazo, con un aumento de volumen en las últimas etapas de la gestación [5]. Si hay una diferencia significativa en la antigenicidad de glóbulos rojos entre el feto y la madre, se puede producir una alosensibilización del sistema inmune de la madre antes o después del parto. Los anticuerpos maternos para los antígenos fetales de glóbulos rojos pueden pasar clínicamente desapercibidos o provocar secuelas autoinmunes peligrosas para la vida, ya sea en el embarazo actual o en otros posteriores (por ejemplo, eritroblastosis fetal o aborto temprano). Dicha sensibilización puede ocurrir con cualquier incompatibilidad de antígenos de glóbulos rojos, pero la frecuencia más alta y las consecuencias clínicas más graves ocurren con incompatibilidades de Rh o de antígeno D. La detección y enumeración de glóbulos rojos fetales es una parte esencial del tratamiento de aquellas pacientes con FMH a las que se les administra preparados de inmunoglobulina Rh (RhIG) [6]. El uso de una profilaxis con inmunoglobulina Rh es una práctica universal, aunque las cantidades y el calendario de las dosis presentan variaciones regionales [7,8]. Por lo tanto, la sensibilidad y la especificidad de los análisis de detección de FMH es un factor esencial de la eficacia terapéutica y del resultado clínico posterior.

El análisis que se utiliza con más frecuencia para la detección de la FMH es el método de recuento microscópico visual de Kleihauer-Betke (KB), que se basa en las diferencias de las propiedades de solubilidad en condiciones ácidas de la hemoglobina fetal (HbF) con respecto a la hemoglobina de los adultos [9]. Aunque el método KB se realiza con facilidad en la mayoría de los laboratorios clínicos, carece de sensibilidad y presenta una baja reproducibilidad o precisión (coeficiente de variación (CV) del 50 - 100%) [10,11]. Se han desarrollado métodos de citometría de flujo utilizando las diferencias antigénicas o la evaluación cuantitativa de la hemoglobina fetal (HbF) para distinguir los glóbulos rojos fetales de los glóbulos rojos del adulto. Estos métodos son más exactos y menos subjetivos [12-22]. No obstante, muchos laboratorios continúan utilizando el método KB debido a la disponibilidad limitada de la citometría de flujo.

IQ Products FMH QuikQuant™ es un método de citometría de flujo para la detección y cuantificación de la FMH. El análisis utiliza un anticuerpo monoclonal de anti-hemoglobina F y el reactivo yoduro de propidio en una técnica sin lavado que requiere alrededor de 45 minutos para realizarse. Requiriendo menos de 15 minutos de tiempo del tecnólogo, es más eficaz que el análisis KB, además de ser más sensible y preciso.

Aplicación

La determinación en laboratorio del nivel de células fetales en el sistema circulatorio materno sigue siendo una herramienta importante en el tratamiento obstétrico de mujeres con trauma uterino potencial y en la administración correcta de las dosis de inmunoglobulina Rh.

Componentes del producto

- 1,0 mL de FMH QuikQuant™ antibody reagent para citometría de flujo (100 pruebas)
- 40 mL de solución de permeabilización IQ Products *Intra-Cell™*, suministrada como concentrado 10X contiene 1.0 % de Triton-X 100   ADVERTENCIA
- 40 mL FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate, suministrada como concentrado 10X

Reactivos y materiales necesarios, pero no incluidos

- Tubos de poliestireno desechables de 12 x 75 mm con bastidor
- Puntas de pipeta, (1-200 µL) y (200-1000 µL)
- Pipetas de volumen ajustable (0-200 µL y 200-1000 µL)
- Medio salino tamponado con fosfato (PBS) o PBS de Dulbecco Sigma n.º P3813 o CellGro n.º 21-031-CM
- Glutaraldehído (0,03% ± 0,015%)
 - Glutaraldehído al 8% para la disolución Sigma n.º G7526 o Polysciences n.º 00216A
 - **O BIEN**
 - Glutaraldehído al 25% para la disolución Sigma n.º G5882 o Polysciences n.º 01909
- Agua de calidad reactiva, preferiblemente filtrada
- Filtro de vacío de 0,2 µm (optativo pero recomendado)
- FETALtrol™ (IQ Products) o sangre de cordón umbilical de fabricación local para 3 niveles de control en análisis de hemorragia fetomaternal
- Agitador vórtex
- Lavadora de células para banco de sangre o centrifugadora capaz de alcanzar 600 x g
- Citómetro de flujo multiparamétrico, con capacidad para al menos 3 parámetros de fluorescencia
- Software para análisis de archivos modo lista en formato FCS

Preparación del Reactivo

1 PBS

- PBS de Dulbecco 1000 mL CellGro n.º 21-031-CM o equivalente
- **O BIEN**
- Polvo salino tamponado con fosfato 1 paquete Sigma n.º P 3813 o equivalente
- H₂O de calidad reactiva q.s. para 1000 mL
- Mezclar bien
- Filtrar usando un filtro de vacío con poros de 0,2 µm, si está disponible, para eliminar los residuos de partículas
- Ajustar el pH a 7,4 cuando la solución alcance la temperatura ambiente (20-25 °C)
- Almacenar en refrigerador a 2-8 °C
- La caducidad se determinará siguiendo el procedimiento estándar del laboratorio. El uso de agua estéril/filtrada como diluyente ampliará la vida útil hasta los 30 días a 2-8 °C.

2 FMH QuikQuant™ buffer working solution - equivalente a PBS con albúmina sérica bovina (BSA) (0,5%)

- H₂O de calidad reactiva 9 partes
- FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate 1 parte
- **Por ejemplo: 9 mL de H₂O y 1 mL de concentrado de IQ Products BSA combinados**
- Mezclar bien
- Filtrar usando un filtro de vacío con poros de 0,2 µm, si está disponible, para eliminar los residuos de partículas
- Ajustar el pH a 7,4 cuando la solución alcance la temperatura ambiente (20-25 °C)
- Almacenar en refrigerador a 2-8 °C
- Caducidad: se determinará siguiendo el procedimiento estándar del laboratorio. El uso de agua estéril/filtrada como diluyente ampliará la vida útil hasta los 30 días a 2-8 °C.

3 Dilución de trabajo de glutaraldehído: 0,03%

Nota: puesto que la pureza del glutaraldehído puede variar con el fabricante o los lotes, deben evaluarse las concentraciones de glutaraldehído entre 0,015% y 0,045% para optimizar la separación de la tinción de glóbulos rojos fetales y de adulto con el análisis (separación deseable de 2 o más logaritmos).

Almacenar las **existencias** de glutaraldehído en un congelador (las ampollas pueden dividirse en partes alícuotas en tubos de polipropileno y volver a congelarse) o en un refrigerador siguiendo las recomendaciones del fabricante. Fabricar solución de trabajo nueva cada día de uso

- Solución de reserva de glutaraldehído de calidad EM o I al **8%** 94 µL Sigma n.º G7526 o Polysciences n.º 00216A
- PBS (pH 7,4) 25 mL (consultar PBS arriba)
- **O BIEN**
- Solución de reserva de glutaraldehído de calidad EM o I al **25%** 30 µL Sigma n.º G5882 o Polysciences n.º 01909
- PBS (pH 7,4) 25 mL (consultar PBS arriba)
- Mezclar bien y mantener en un refrigerador (2-8 °C) hasta 2 horas antes de su uso
- Caducidad: desechar el glutaraldehído diluido no utilizado. Consultar el envase del fabricante para conocer la caducidad del glutaraldehído de reserva.

4 IQ Products Intra-Cell™ para permeabilización celular

- El concentrado de reactivo IQ Products Intra-Cell™ debe mantenerse a temperatura ambiente (20-25 °C) y mezclarse bien antes de la dilución para evitar que se formen precipitados sólidos.
- Preparar una solución de trabajo con dilución 1:10 a partir del concentrado de reactivo Intra-Cell™, por ejemplo:
 - Concentrado de IQ Products Intra-Cell™ 5 mL
 - Agua (H₂O) de calidad reactiva 45 mL
- Mezclar bien y almacenar la solución de **trabajo** (IQ Products Intra-Cell™ diluida a 1:10) en un refrigerador (2-8 °C).
- Caducidad: la solución de trabajo caduca a los 30 días o en el momento de la detección si se observa en ella cualquier turbidez. La solución de reserva se puede utilizar hasta que venza la fecha de la etiqueta.

Muestra

Sangre completa con EDTA u otras muestras con anticoagulante

- Refrigerar la muestra si la prueba no se realiza en el plazo de 4 horas desde su obtención.
- Las muestras pueden mantenerse refrigeradas durante 72 horas antes de la prueba [1].

Preparación de la muestra

- 1 Realice una dilución 1:20 de FETALtrol™ o sangre con anticoagulante EDTA utilizando PBS con BSA al 0,5% o la FMH QuikQuant™ buffer working solution.
- 2 Coloque 10 µL de las células diluidas en un tubo de plástico de poliestireno de 12 X 75 mm.
- 3 Agregue 0,75 mL de glutaraldehído (glutaraldehído al 0,03% en PBS **sin** BSA) al tubo.
- 4 Tras agregar el glutaraldehído a las células, agite 10 minutos en el vórtex de forma intermitentemente durante la incubación a temperatura ambiente. Evite la formación de aglomeraciones de glóbulos rojos; para ello, asegúrese de que las células permanecen en suspensión durante este paso de fijación.
- 5 Agregue 1,5 mL de la solución de trabajo IQ Products Intra-Cell™ a cada tubo e incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 6 Tras agregar la solución Intra-Cell™, agite en el vórtex al menos dos veces durante la incubación, reduciendo al mínimo de nuevo los agregados celulares.
- 7 Haga girar 60 segundos en la lavadora de células y decante durante 5 segundos. Como alternativa, centrifugue al menos 5 minutos en una centrifugadora de 600 x g y decante el sobrenadante.
- 8 Agite en el vórtex al menos 15 segundos para dispersar totalmente los gránulos.
- 9 Agregue 10 µL FMH QuikQuant™ antibody reagent, a continuación, 40 µL FMH QuikQuant™ buffer working solution.
- 10 Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

- 11 Agregue 2,0 mL FMH QuikQuant™ buffer working solution agite en el vórtex e incube a temperatura ambiente durante 30 segundos. **Nota: para facilitar la mezcla sin que se produzcan derrames, se sugiere agregar 1 mL, agitar suavemente en el vórtex, agregar el otro 1 mL y mezclar de nuevo.**
- 12 Haga girar 60 segundos en la lavadora de células y decante durante 5 segundos. Como alternativa, centrifugue al menos 5 minutos en una centrifugadora de 600 xg y decante el sobrenadante.
- 13 Agregue 1,0 mL QuikQuant™ buffer working solution mezcle el tubo a conciencia y evite la exposición a la luz. Procese en el citómetro de flujo, recogiendo un mínimo de 100.000 glóbulos rojos para el análisis.

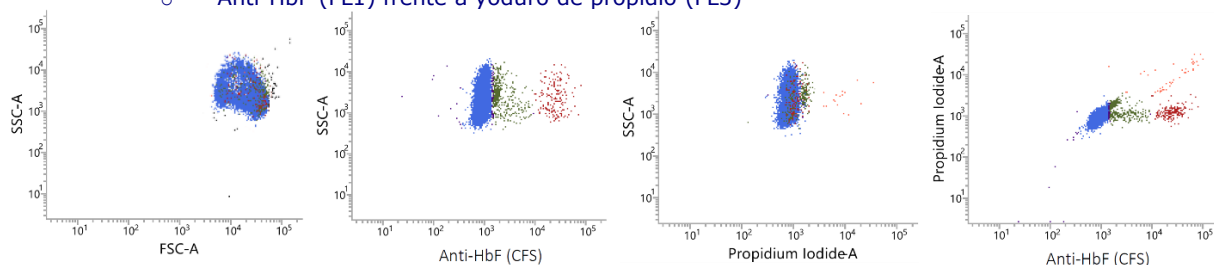
Configuración del citómetro de flujo

- 1 Seleccione 2 muestras de sangre, una de sangre de adulto con un alto número de glóbulos blancos y otra de sangre de adulto incrementada con células de cordón umbilical compatibles con ABO lavadas o con FETALtrol™ para 3 niveles de control. (Todos los glóbulos rojos deben lavarse dos veces y volver a suspenderse en PBS/BSA antes de la mezcla o el incremento para eliminar todas las hemaglutininas que puedan provocar aglomeración).
- 2 Tíña de acuerdo con el procedimiento de tinción del análisis FMH QuikQuant™.
- 3 Utilice los pasos siguientes para configurar el protocolo del citómetro:

a) Obtenga lo siguiente:

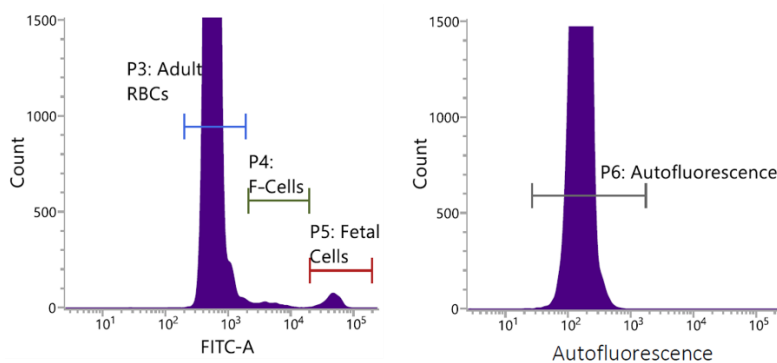
- **Histogramas de dos parámetros:**

- Dispersión hacia delante (FSC) frente a dispersión lateral (SSC) (logarítmica-logarítmica)
- Anti-HbF (FL1) frente a SSC-logarítmica
- Yoduro de propidio (FL3) frente a SSC-logarítmica
- Anti-HbF (FL1) frente a yoduro de propidio (FL3)



- **Histogramas de un único parámetro:**

- Número frente a anti-HbF (FL1)
- Número frente a autofluorescencia (FL2) (optativo)



Y un **cuadro de resultados** que muestre eventos de glóbulos rojos sobre umbral, glóbulos rojos de adulto, células F de adulto y glóbulos rojos fetales (la autofluorescencia y las células nucleadas son optativas).

Statistics					
Sample ID (QuikQuant) A4					
Acquisition Date (QuikQuant) 4/1/2021					
Name	Events	% Total	% Parent	% Grandparent	FITC-A Mean
QuikQuant:All Events	100,000	100.00	***	***	1,443
QuikQuant:P1	99,503	99.50	99.50	***	1,399
QuikQuant:P2	99,189	99.19	99.68	99.19	1,234
QuikQuant:P3: Adult RBCs	97,024	97.02	97.82	97.51	612
QuikQuant:P4: F-Cells	881	0.88	0.89	0.89	5,245
QuikQuant:P5: Fetal Cells	1,156	1.16	1.17	1.16	50,257
QuikQuant:P6: Autofluorescence	99,149	99.15	99.96	99.64	1,226

- b) Al procesar el tubo que contiene la **mezcla teñida de sangre de adulto/cordón umbilical** (o **FETALtrol™** para 3 niveles de control), ajuste la FS-logarítmica y la SS-logarítmica de forma que la población de glóbulos rojos quede en mitad de la escala de ambos ejes.

- c) Ajuste el umbral de la FS para eliminar los eventos no deseados (plaquetas y residuos celulares) que tienen una señal más baja que la población de glóbulos rojos.
- d) Ajuste FL1 (anti-HbF) y FL3 (yoduro de propidio) de forma que la población de glóbulos rojos quede en la primera década de ambos parámetros y se pueda visualizar el pico completo en los histogramas. Mientras que el yoduro de propidio (PI) es un marcador específico de las células nucleadas, la autofluorescencia se puede utilizar para definir regiones al enumerar las células F [22].
- e) Al procesar el tubo que contiene la **muestra teñida con un alto número de glóbulos blancos**, ajuste la compensación FL3-FL1 de forma que los glóbulos rojos (teñidos) a lo largo del eje FL1 queden sobre todo en la primera década en el eje FL3, pero sin tener > 1% de glóbulos rojos en la línea de base de la señal FL1.
- f) Coloque una región de umbral alrededor de los glóbulos rojos, **excluyendo los agregados de glóbulos rojos**, los residuos celulares y las células nucleadas (eventos positivos para yoduro de propidio). Asegúrese de que el histograma de un único parámetro se basa en este umbral (G1 = R1). Defina las regiones de análisis para glóbulos rojos de adulto, células F de adulto y glóbulos rojos fetales (consulte más abajo el ajuste de regiones) en el histograma de un único parámetro de anti-HbF.
- g) Asigne un nombre y guarde los ajustes del instrumento y la plantilla del protocolo con el protocolo de adquisición también configurado para recoger al menos 100.000 eventos en un archivo modo lista con todos los parámetros (FS, SS, FL1, FL2 y FL3).

Análisis del archivo modo lista

El análisis de los archivos modo lista se debe realizar según se muestra en los histogramas de arriba. Se debe utilizar una región de umbral para excluir las células nucleadas del análisis; se recomienda que sea un trazado de dispersión lateral frente a yoduro de propidio. Las estrategias de umbral adicionales deben incluir un medio de exclusión de los agregados de glóbulos rojos del análisis, sirviéndose de un umbral de dispersión de luz hacia delante-ángulo (FALS) frente a dispersión lateral. Un exceso de agregados de glóbulos rojos (> 1%) puede causar una indicación excesivamente significativa del porcentaje de glóbulos rojos fetales, ya que los agregados provocan un recuento inferior del verdadero denominador. Como se muestra arriba, también se recomienda que las regiones de análisis se creen en un trazado de un único parámetro de anti-HbF usando tres regiones que correspondan a glóbulos rojos de adulto, células F de adulto y glóbulos rojos fetales. La desactivación de cualquier función de ajuste automático de escala en el software de análisis permitirá una mejor visualización de la población de glóbulos rojos fetales.

Como alternativa, la presentación de dos parámetros de expresión de anti-HbF frente a autofluorescencia también puede constituir un medio eficaz para definir la región de identificación de glóbulos rojos fetales. No existe un método consensuado para definir las regiones de glóbulos rojos de adulto y células F de adulto, aunque hemos propuesto un enfoque mediante la señal de autofluorescencia [23]. Primero debe establecerse la región de análisis de glóbulos rojos fetales mediante las muestras de control para definir la región de análisis a ambos lados del pico de glóbulos rojos fetales en la muestra de control alto (normalmente 1-2% de glóbulos rojos fetales).

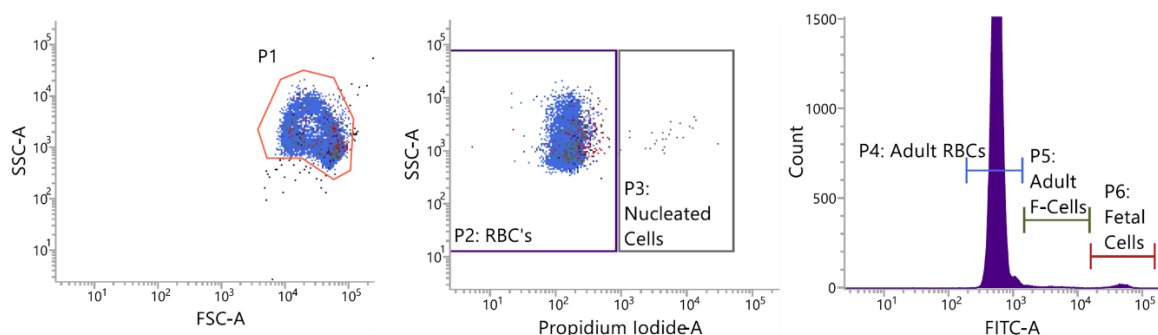


Figura 1. El análisis de los datos debe incluir umbrales para excluir los agregados de glóbulos rojos (umbral P1) y las células nucleadas (umbral P3); a continuación, se procede a la enumeración de glóbulos rojos de adulto (región P4), células F de adulto, si se desea, (región P5) y glóbulos rojos fetales (región P6).

Control de calidad del análisis

Es imprescindible utilizar muestras de control analizadas en varios niveles como medio para evaluar tanto el procedimiento como el análisis. Una intensidad de tinción baja, los daños celulares debidos a una concentración incorrecta de las soluciones de fijación y/o de permeabilización, unos niveles incrementados de células F, una compensación incorrecta y un umbral por debajo del óptimo pueden afectar gravemente a la validez de los resultados generados. Hay dos fuentes principales de muestras de control de calidad:

1. **FETALtrol™** - producto de control de sangre; una alternativa idónea a los controles de "fabricación local". Contiene viales de controles negativo, positivo de nivel bajo (~0,15% de glóbulos rojos fetales) y positivo de nivel alto (~1,5% de glóbulos rojos fetales) y tiene una vida útil de tres meses. Este producto se utiliza exactamente como la sangre completa en este procedimiento y ha sido aprobado por la FDA de EE. UU. como un control de diagnóstico *in vitro*.
2. **Muestras de sangre incrementadas de fabricación local** - mezclas de sangre fetal coincidente según ABO o de cordón umbilical con sangre de adulto. Lo ideal sería disponer de controles alto, bajo y negativo con valores validados para glóbulos rojos fetales.

Manipulación y almacenamiento

Almacenar los viales del FMH QuikQuant™ antibody reagenten vertical y bien tapados a 2-8 °C cuando no se estén utilizando. Almacenar el concentrado *Intra-Cell*™ en vertical y bien tapado **a temperatura ambiente**. Evitar los ciclos innecesarios de calentamiento y enfriamiento de todos los reactivos. Proteger el producto de la congelación, de la exposición a temperaturas superiores a 30 °C y de la exposición a temperatura ambiente (18-25 °C) durante un tiempo prolongado, salvo el concentrado *Intra-Cell*™. No exponer a la luz. Almacenar el concentrado FMH QuikQuant™ buffer solution concentrado en vertical y a temperatura ambiente (18-25 °C). Los reactivos almacenados de acuerdo con las instrucciones de almacenamiento indicadas son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Advertencia

El FMH QuikQuant™ antibody reagent y el FMH QuikQuant™ buffer working solution contienen azida sódica (< 0,1% p/v). Este producto químico se convierte en un compuesto tóxico y peligroso cuando se combina con ácidos o con metales. Manipular con el cuidado adecuado. Las soluciones que contienen azida sódica se deben eliminar correctamente. La solución de permeabilización FMH QuikQuant™ *Intra-Cell*™ contiene Triton-X 100, un reactivo tóxico, que debe manipularse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y tomando las precauciones adecuadas. Evite el contacto con la piel o los ojos y su liberación al medio ambiente. Se recomienda seguir el procedimiento interno aconsejado por el fabricante del citómetro de flujo después de utilizar yoduro de propidio en la medición. Para obtener información detallada, consulte la Ficha de datos de seguridad en: www.iqproducts.nl. Tenga en cuenta la obligación de los usuarios de este kit de notificar al fabricante y a las autoridades designadas los incidentes relacionados con este producto.

Control de calidad de fabricación

El rendimiento y la especificidad de los reactivos contenidos en este kit se someten a prueba mediante métodos de control de calidad internos de IQ Products. La fabricación de este producto se realiza utilizando unas directrices de sistema de calidad y producción de fabricación que están de acuerdo con la normativa de sistemas de calidad (QMRS) de la FDA y la norma EN ISO 13485:2016.

Limitaciones del producto

Las siguientes afecciones clínicas pueden dar lugar a un nivel mayor de HbF, por unos niveles elevados de células F de adulto, y no se deben confundir con una hemorragia fetomaternal [22-24]:

- Anemia grave
- Persistencia hereditaria de HbF
- Talasemia
- Anemia drepanocítica, especialmente si se está en tratamiento con hidroxurea, butirato u otros fármacos que elevan la HbF

Errores Potenciales

- La tinción inadecuada y la separación pobre suelen ser el resultado de una fijación y/o una permeabilización incorrectas. El glutaraldehído debe almacenarse correctamente y diluirse poco antes de su uso en el paso de fijación. Si las células no se fijan adecuadamente mediante el glutaraldehído, se producirá su lisado al agregar *Intra-Cell*™. Si el paso de *Intra-Cell*™ no se realiza correctamente, el anticuerpo conjugado HbF no será capaz de alcanzar su objetivo dentro de la célula [24].
- Configuración del instrumento o ajustes de compensación no optimizados.
- No utilizar una región para la definición de las células fetales basada en un control positivo, como FETALtrol™.
- La mezcla pobre y/o el uso de glutaraldehído de una concentración mayor que la óptima pueden generar agregados, lo que se suele detectar por la presencia de una aglomeración celular y por unos resultados más altos que los previstos para las muestras de FETALtrol.
- No diluir el concentrado de la solución de permeabilización 10X IQ Products *Intra-Cell*™ provocará aglomeración o aglutinación (similares en aspecto macroscópico a aglutininas frías o pilas de monedas), lo que afectará negativamente a la exactitud de los valores obtenidos.
- Las soluciones no filtradas pueden contener micropartículas que serán detectadas y contadas por el instrumento. Esto puede reducir el número de eventos útiles (glóbulos rojos) en el recuento total y dificultar el análisis o afectar negativamente a la exactitud de los valores obtenidos.
- Las muestras obtenidas después de una transfusión con agregados celulares mediados inmunológicamente pueden arrojar falsos valores elevados de células fetales. Este problema se puede evitar excluyendo los agregados.
- No excluir las células nucleadas autofluorescentes durante el análisis de los datos puede provocar una falsa elevación del nivel de glóbulos rojos fetales.

Valores previstos y su derivación

Cada laboratorio debe establecer un intervalo de referencia aceptable para los análisis de hemorragia fetomaternal. Se prevé que la media del laboratorio de los resultados de glóbulos rojos fetales para las muestras de sangre de mujeres no embarazadas y sanas sea ≤0,06%. Los niveles de células F de adulto no se suelen divulgar, pero la documentación sugiere que la mayoría de las muestras deben tener < 5% de células F [25]. Se han estudiado donantes de laboratorio normales y aparentemente sanos en tres ubicaciones. Estos resultados deberían servir como directrices. Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia.

Características de rendimiento

Los resultados del estudio interno mostraron que el anticuerpo dirigido contra la HbF se une específicamente a la hemoglobina fetal y no reconoce la hemoglobina adulta.

Tabla 1. Datos del estudio de sensibilidad FMH Quikquant™. Se ha determinado la sensibilidad del análisis mediante estudios de dilución de mezclas de IQ Products FETALtrol™ (niveles alto, bajo y negativo) seguidos de medidas replicadas en un instrumento FACScan de Becton Dickinson. Como se muestra arriba, las muestras con glóbulos rojos fetales tan bajos como 0,04% se pueden distinguir significativamente ($P < 0,05$) de las muestras que carecen de células fetales.

% g. rojos fetales esperado	Réplica 1	Réplica 2	Media	Desviación estándar	CV	Valor 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

Tabla 2. Datos de estudios de precisión FMH QuikQuant™. Se ha determinado la imprecisión del análisis mediante estudios de mezclas de IQ Products FETALtrol™ seguidos de medidas replicadas en un instrumento FACScan de Becton Dickinson. Las muestras con glóbulos rojos fetales tan bajos como 0,17% tienen un coeficiente de variación (CV) < 5%.

Réplica	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 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
Desviación estándar	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
CV	33,3%	4,1%	3,4%	3,3%	1,2%

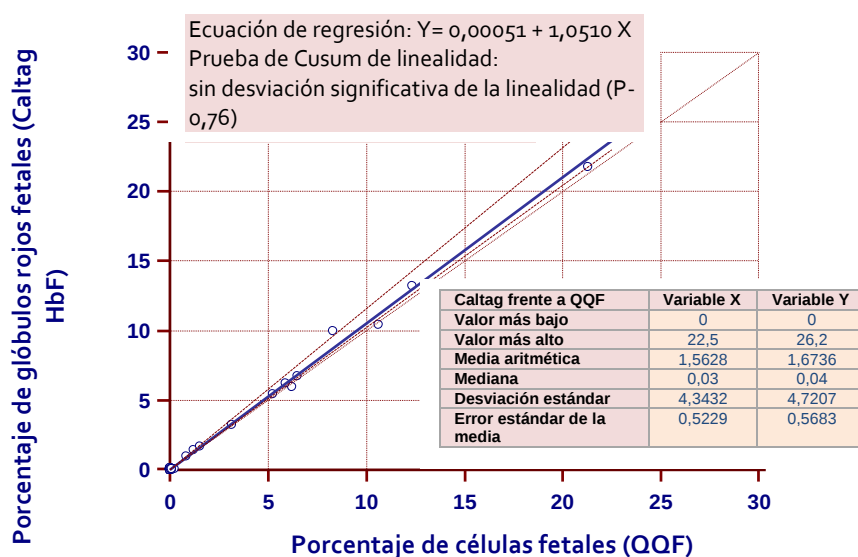


Figura 2. FMH QuikQuant™ no muestra una desviación significativa de la linealidad. Se ha obtenido la linealidad del análisis mediante la regresión de Passing-Bablok entre el porcentaje de glóbulos rojos fetales determinado a través de los análisis de citometría de flujo Caltag Fetal Hgb y FMH QuikQuant™ (QQF).

Evaluación clínica:

Los resultados de las pruebas de 74 y 56 muestras clínicas en dos ubicaciones diferentes durante un estudio de evaluación del rendimiento han demostrado que la correlación entre la prueba de Kleihauer Betke y el FMH QuikQuant™ fue excelente ($r^2 = 0,968$ y $r^2 = 0,998$ respectivamente). La bibliografía confirma esta correlación y establece que el FMH QuikQuant™ es un método más preciso, debido a la sobreestimación de FMH por el KB [27-28]. Los antecedentes de los datos de rendimiento clínico se pueden obtener a través de marketing@iqproducts.nl.

Estado administrativo

En este momento, el FMH QuikQuant™ está registrado como "dispositivo médico de diagnóstico in vitro" en Australia, Suiza, Perú, Reino Unido y en los países pertenecientes a la Comunidad Europea. En todos los otros países debe ser etiquetado "se utilice sólo para la investigación".

Referencias

- 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 Mundee 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.
- 27 Corcoran D, Murphy D, Donnelly JC, Ainle FN. The prevalence of maternal F cells in a pregnant population and potential overestimation of foeto-maternal haemorrhage as a consequence. *Blood Transfus.* 2014 Oct;12(4):570-4.
- 28 Pastoret C, Le Priol J, Fest T, Roussel Evaluation of FMH QuikQuant for the detection and quantification of fetomaternal hemorrhage. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Jan- Feb;84(1):37-43

Garantía

Únicamente se garantiza que los productos vendidos se corresponden con la cantidad y el contenido que figuran en la etiqueta en el momento de la entrega al cliente. No existe ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá de la descripción en la etiqueta del producto. IQ Products BV no será responsable de los daños materiales, daños personales o pérdidas económicas causados por el producto.

Explicación de los símbolos usados [26]

	Consulte las instrucciones de uso
	Número de catálogo
	Suficiente para
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Atención, ver instrucciones de uso
	Mantener fuera de la luz (solar)
	Riesgos biológicos
	Límite de temperatura (°C)
	Para uso exclusivo en investigación
	Código de lote
	Fecha de caducidad
	Fabricante
	Representante autorizado en la Comunidad

Atención al cliente

IQ Products BV

www.iqproducts.nl
 Rozenburglaan 13a
 9727 DL Groningen

Países Bajos

 +31 (0)50 5757000

 Técnica marketing@iqproducts.nl

 Pedidos orders@iqproducts.nl

www.iqproducts.nl

FMH QuikQuant™

Nopea Määritys Fetomaternaalisien Verenvuodon Kvantifioimiseen

 QQF-100  
 100 testit  pakkausseloste

Käyttötarkoitus

FMH QuikQuant™ on tarkoitettu ihmisen sikiön punasolujen (fRBC) erottamiseen ja kvantitatiiviseen havaitsemiseen äidin veressä. Tätä menetelmää, jota käytetään fetomaternaalisien verenvuodon (FMH) diagnosointiin, sovelletaan raskaana olevien naisten perifeerisiin verinäytteisiin, joilla on vatsatrauma ja / tai epäillään Rhesus D (RhD) - yhteensopimattomuutta. FMH QuikQuant™ perustuu herkkään ja tarkkaan, ei-automatisoituun virtaussytometriseen menetelmään, joka tarjoaa solunsisäisen antigeenin, sikiön hemoglobiinin (HbF), fluoresoivan havaitsemisen. HbF havaitaan punasoluista, jotka on saatu EDTA-hyytymistä estävästä tai hepariinilla käsitellystä ihmisen perifeerisestä kokoverestä. FMH QuikQuant™ on tarkoitettu koulutettujen lääketieteellisten teknikoiden tai vastaavien, sikiön verenvuodon testausmenetelmistä ja virtaussytometriasta kokemusta omaavien henkilöiden käytettäväksi sairaalan klinisissä ja vertailulaboratorioissa.

Yhteenveto Ja Periaate

Tärkein sikiön punasolujen havainnoinnin tarkoitus on fetomaternaalisien verenvuodon (FMH) arviointi [1-4]. FMH:a esiintyy normaalisti koko raskauden ajan pieninä määrinä ja lisääntyy raskauden myöhemmissä vaiheissa [5]. Jos sikiön ja äidin punasolujen antigeenisuudessa on merkittävä ero, tämä voi johtaa äidin immuunijärjestelmän allosensitisaatioon joko ennen synnytystä tai sen jälkeen. Äidin vasta-aineet sikiön RBC-antigeeneille voivat olla kliinisesti ilmentymättömiä tai aiheuttaa hengenvaarallisia autoimmuunisia sairauksia nykyisille tai myöhemmille raskauksille (esim. Erythroblastosis fetalis tai varhainen abortti). Tällainen herkistyminen voi olla seurauksena mistä tahansa RBC-antigeenien eroavaisuuksista, mutta yleisimmät ja vakavimmat kliiniset seuraukset johtuvat Rh- tai D-antigeenien eroista. Sikiön punasolujen havaitseminen ja kvantifiointi on olennainen osa FMH-potilaiden hoitoa, joita hoidetaan Rh-immuunoglobuliinivalmisteilla (RhIG) [6]. Rh-immuunoglobuliiniprofylaksian käyttö on yleinen käytäntö, mutta annosmäärillä ja aikatauluilla on alueellisia eroja [7,8]. Siksi FMH: n detektiomääritysten herkkyys ja spesifisyys on tärkeää terapeuttisen tehon ja myöhemmän kliinisen tuloksen kannalta.

Yleisimmin käytetty testi FMH:n havaitsemiseksi on ollut visuaalinen mikroskooppinen laskentamenetelmä Kleihauer-Betke (KB), joka perustuu sikiön hemoglobiiniin (HbF) ja aikuisen hemoglobiinin liukoisuuseroihin happamissa olosuhteissa [9]. Vaikka useimmat kliiniset laboratoriot suorittavat KB-menetelmän helposti, menetelmä ei ole herkkä, ja sillä on heikko toistettavuus tai tarkkuus (CV:t 50-100%) [10,11]. Virtaussytometrisiä menetelmiä on kehitetty havainnoimaan sikiön hemoglobiinin (HbF) antigeenien eroja tai kvantifioimaan sikiön punasoluja aikuisten punasoluista. Nämä menetelmät ovat tarkempia ja vähemmän subjektiivisia [12-22]. Siitä huolimatta monet laboratoriot ovat edelleen käyttäneet KB-menetelmää virtaussytometrian rajoitetun saatavuuden vuoksi.

FMH QuikQuant™ on virtaussytometrinen menetelmä FMH:n havaitsemiseksi ja kvantitoimiseksi. Määrityksessä käytetään anti-Hemoglobin F-monoklonaalista vasta-ainetta ja propidiumjodidireagenssia tekniikassa, joka ei vaadi pesua ja joka kestää noin 45 minuuttia. Alle 15 minuuttia tekniikan aikaa tarvitsevana se on käytössä sekä tehokkaampi, herkempi että tarkempi kuin KB-määritys.

Sovellus

Sikiösolujen määrän laboratoriomääritys äidin verenkierron osassa on edelleen tärkeä työkalu kohdun traumasta epäiltyjen naisten synnytyksen hoidossa ja Rh-immuunoglobuliinin asianmukaisessa annostuksessa.

Tuotteen Komponentit

- 1,0 ml FMH QuikQuant™ antibody reagent virtaussytometriaan (100 testiä)
- 40 ml *Intra-Cell™* - permeabilisaatioliuos - toimitetaan 10X-konsentraattina sisältää 1.0 % Triton-X 100   VAROITUS
- 40 ml FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate- toimitetaan 10X-konsentraattina

Vaadittavat Materiaalit, Jotka Eivät Sisälly Tuotteeseen

- 12 x 75 mm kertakäyttöisiä polystyreeniputkia telineellä
- Pipettikärjet (1-200 µL) ja (200-1000 µL)
- Säädettävät tilavuuspipetit (0-200 ja 200-1000 µL)
- Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) tai Dulbecco PBS Sigma #P3813 tai CellGro #21-031-CM
- Glutaarialdehydi (0.03% ± 0.015%)
 - 8% glutaarialdehydi laimennusta varten Sigma #G7526 tai Polysciences #00216A
 - TAI**
 - 25% glutaarialdehydi laimennusta varten Sigma #G5882 tai Polysciences #01909
- Reagenssilaatuinen vesi, suodatettu on suositeltavaa
- 0,2 µm vakuumiudatin (valinnainen, mutta suositeltava)
- FETALtrol™ (IQ Products) tai "home brew"-napanuoraverta kolmelle kontrollitasolle fetomaternaalisia verenvuototestejä varten
- Vortex-sekoitin
- Veripankkisolujen pesulaite tai sentrifugi, jolla voidaan saavuttaa 600 x g
- Moniparametrinen virtaussytometri, joka pystyy suorittamaan vähintään 3 fluoresenssiparametriä
- Ohjelmisto FCS-muotoisten luettelotilan tiedostojen analysointiin

Reagenssin Valmistus

1 PBS

- Dulbeccan PBS 1000 mL CellGro #21-031-CM tai vastaava
- TAI**
- PBS-jauhe 1 paketti Sigma #P3813 tai vastaava
- Reagenssilaatuinen H₂O q.s. 1000 mL
- Sekoita kaikki liuokset hyvin ennen pH:n säätöä tai suodatusta
- Suodata 0,2 µm:n huokoskoon vakuumsuodattimella, jos sellainen on käytettävissä hiukkasten poistamiseksi
- Säädä pH arvoon 7,4, kun liuos saavuttaa huoneen lämpötilan (20-25 °C)
- Säilytä jääkaapissa 2-8 °C: ssa
- Viimeinen käyttöpäivä määritetään laboratoriomenetelmällä. Steriilin / suodatetun veden käyttö laimennusaineena pidentää säilyvyyttä 30 päivään 2-8 °C: ssa.

2 FMH QuikQuant™ buffer working solution - vastaa PBS:ään liuotettua BSA:ta (0,5%)

- Reagenssilaatuinen H₂O 9 osaa
- FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate 1 osa
- Esimerkiksi: 9 ml H₂O ja 1 ml BSA-konsentraattia yhdessä**
- Sekoita hyvin
- Suodata 0,2 µm:n huokoskoon vakuumsuodattimella, jos sellainen on käytettävissä hiukkasten poistamiseksi
- Säädä pH arvoon 7,4, kun liuos saavuttaa huoneen lämpötilan (20-25 °C)
- Säilytä jääkaapissa 2-8 °C:ssa
- Viimeinen käyttöpäivä: määritetään laboratoriomenetelmällä. Steriilin / suodatetun veden käyttö laimennusaineena pidentää säilyvyyttä 30 päivään 2-8 °C: ssa.

3 Glutaarialdehydin käyttöläimennus: 0,03%

Huomautus: Koska glutaarialdehydin puhtaus voi vaihdella valmistajan tai erien mukaan, glutaraldehydin pitoisuuksia 0,015-0,045% välillä tulisi arvioida aikuisen ja sikiön punasolujen värjäämisen optimoimiseksi (2 logaritmisien skaalan ero tai suurempi toivottavaa).

Säilytä glutaarialdehydiä pakastimessa (ampullit voidaan jakaa eriin polypropeenimikroputkiin ja pakastaa uudelleen) tai jääkaapissa valmistajan suositusten mukaisesti. Uusi käyttöliuos tulisi valmisteta joka päivä.

- 8%** EM-luokan tai luokan I glutaarialdehydikantaliuos 94 µL Sigma #G7526 tai Polysciences #00216A
25 mL (katso PBS yllä)
- PBS (pH 7.4)
- TAI**
- 25%** EM-laatu tai laatu I glutaarialdehydikantaliuos 30 µL Sigma #G5882 tai Polysciences #01909
25 mL (katso PBS yllä)
- PBS (pH 7.4)
- Sekoita hyvin ja pidä jääkaapissa (2-8°C) enintään 2 tuntia ennen käyttöä
- Viimeinen käyttöpäivä: hävitä käyttämätön laimennettu glutaarialdehydi / Katso valmistajan pakkauksesta glutaarialdehydiliuoksen viimeinen käyttöpäivä.

1 Intra-Cell™ Solujen Permeabilisaatiota Varten

- Intra-Cell™ reagenssikonsentraatti on pidettävä huoneenlämmössä (20-25 °C) ja sekoitettava hyvin ennen laimentamista saostumien välttämiseksi.
- Valmista laimennussuhde 1:10 Intra-Cell™ -reagenssikonsentraatista, esimerkiksi
 - Intra-Cell™ konsentraatti 5 mL
 - Reagenssilaatuinen vesi (H₂O) 45 mL
- Sekoita hyvin ja säilytä käyttöliuos (Intra-Cell™ laimennettu 1:10) jääkaapissa (2-8 °C).
- Viimeinen käyttöpäivä: käyttöliuos vanhenee 30 päivän kuluttua tai jos liuoksessa havaitaan samentumaa. Kantaliuosta voidaan käyttää pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Näyte

EDTA-kokoveri (tai muut hyytymisen estetyt näytteet)

- Jäähdytä näyte, jos testiä ei suoriteta 4 tunnin kuluessa keräyksestä
- Näytteitä voidaan pitää jäähdytettynä 72 tuntia ennen testausta [1].

Näytteen Valmistelu

- Laimenna FETALtrol™ tai EDTA:lla hyytymistä estetty veri suhteessa 1:20 käyttämällä 0,5% BSA:ta PBS:ssä tai FMH QuikQuant™ buffer working solution työliuosta.
- Aseta 10 µl laimennettuja soluja 12 x 75 mm:n polystyreenimuoviputkeen.
- Lisää putkeen 0,75 ml glutaarialdehydiä (0,03% glutaraldehydiä PBS:ssä ilman BSA:ta).
- Sekoita Vortexilla, kun glutaraldehydiä on lisätty soluihin ja ajoittain inkuboinnin aikana huoneenlämpötilassa 10 minuutin ajan. Vältä punasoluaggregaattien muodostumista varmistamalla, että solut pysyvät suspensiossa tämän fiksaation aikana.
- Lisää 1,5 ml Intra-Cell™ -liuosta kuhunkin putkeen ja inkuboi huoneenlämpötilassa 10 minuuttia.
- Vorteksoi Intra-Cell™ -liuoksen lisäämisen jälkeen ja vähintään kahdesti inkuboinnin aikana soluaggregaattien minimoimiseksi.
- Sentrifugoi 60 sekuntia solupesurilla ja dekantoi 5 sekuntia. Vaihtoehtoisesti sentrifugoi vähintään 5 minuuttia sentrifugissa nopeudella 600 x g ja dekantoi sitten supernatantti.
- Sekoita vortexilla vähintään 15 sekunnin ajan, kunnes pelletti hajoaa kokonaan.
- Lisää 10 µl FMH QuikQuant™ antibody reagent ja sen jälkeen 40 µl FMH QuikQuant™ buffer working solution työliuosta.
- Inkuboi 10 minuuttia huoneenlämmössä pimeässä.

- 11 Lisää 2,0 ml FMH QuikQuant™ buffer working solution työliuosta, sekoita vortexilla ja inkuboi huoneenlämpötilassa 30 sekuntia. **Huomautus: Sekoittamisen helpottamiseksi roiskumatta on suositeltavaa lisätä 1 ml, sekoittaa varovasti, sitten lisätä toinen 1 ml ja sekoittaa uudelleen.**
- 12 Sentrifugoi 60 sekunnin ajan solujen pesulaitteella ja dekantoi 5 sekunnin ajan. Vaihtoehtoisesti sentrifugoi vähintään 5 minuuttia sentrifugissa nopeudella 600 x g ja dekantoi sitten supernatantti.
- 13 Lisää 1,0 ml FMH QuikQuant™ buffer working solution työliuosta, sekoita putki huolellisesti ja vältä altistumista valolle. Mittaa virtausytometrillä, keräten vähintään 100 000 punasolua analyysia varten.

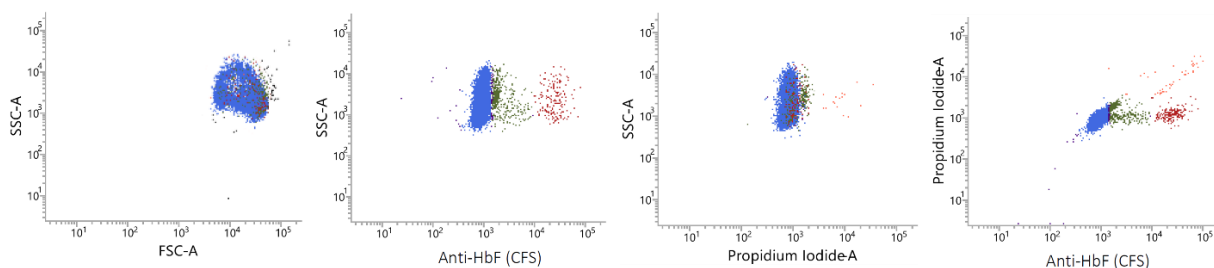
Virtausytometrin asetukset

- 1 Valitse 2 verinäytettä, yksi aikuisen veri, jonka veren valkosolupitoisuus on korkea, ja joko yksi aikuisen veri, johon on lisätty pestyjä, ABO-yhteensopivia napanuorasoluja tai FETALtrol™ -taso 3. (Kaikki punasolut on pestävä kahdesti ja suspendoitava uudelleen PBS/BSA:han ennen sekoittamista hemagglutiniinin poistamiseksi ja aggregaattien muodostumisen välttämiseksi).
- 2 Värjää FMH QuikQuant™-määrityksen värjäysmenettelyn mukaisesti.
- 3 Määritä sytometriprotokolla seuraavasti:

a) Piirrä seuraava:

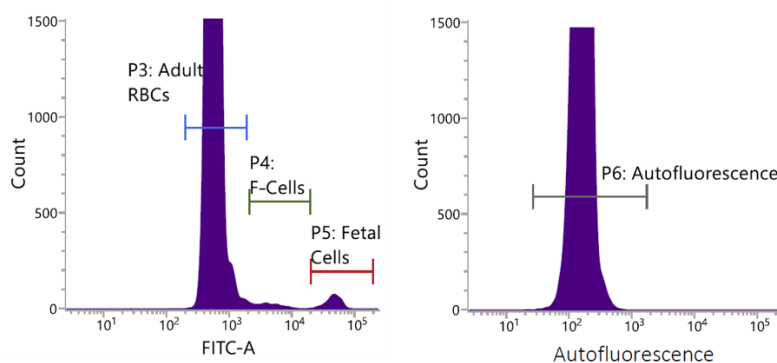
Two-parameter histograms:

- FSC vastaan SSC (log-log)
- Anti-HbF (FL1) vastaan SSC-log
- Propidiumjodidi (FL3) vastaan SSC-log
- Anti-HbF (FL1) vastaan propidiumjodidi (FL3)



Yhden parametrin histogrammi (t):

- Määrä vastaan anti-HbF (FL1)
- Määrä vastaan autofluorescence (FL2) (valinnainen)



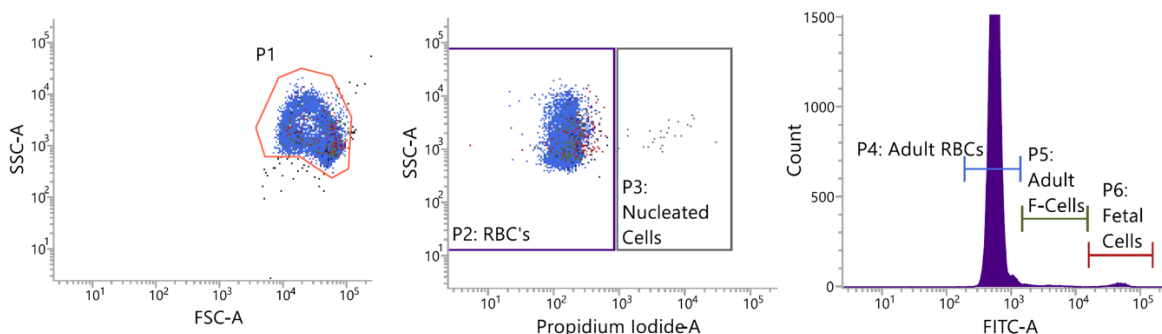
Ja **Tulokset-ruutu**, jossa näkyvät aidatut punasolutapahtumat, aikuisten punasolut, aikuisten F-solut ja sikiön punasolut (autofluoresenssisolut ovat valinnaisia)

Statistics					
Sample ID (QuikQuant) A4					
Acquisition Date (QuikQuant) 4/1/2021					
Name	Events	% Total	% Parent	% Grandparent	FITC-A Mean
QuikQuant:All Events	100,000	100.00	***	***	1,443
QuikQuant:P1	99,503	99.50	99.50	***	1,399
QuikQuant:P2	99,189	99.19	99.68	99.19	1,234
QuikQuant:P3: Adult RBCs	97,024	97.02	97.82	97.51	612
QuikQuant:P4: F-Cells	881	0.88	0.89	0.89	5,245
QuikQuant:P5: Fetal Cells	1,156	1.16	1.17	1.16	50,257
QuikQuant:P6: Autofluorescence	99,149	99.15	99.96	99.64	1,226

- Säädä FS-log ja SS-log siten, että punasolupopulaatio on molempien akselien keskiasteikolla, kun mitaata putkea, joka sisältää **värjättyä aikuisen ja napanuoraveren seosta (tai FETALTrol™ Level 3)**.
- Säädä FS:n kynnyksarvoa eliminoimaan ei-toivotut tapahtumat (verihitaleet, solujätteet), joiden signaali on pienempi kuin veren punasolujen populaatio
- Säädä FL1 (anti-HbF) ja FL3 (propidiumjodidi) niin, että punasolujen populaatio on molempien parametrien ensimmäisellä kymmenellä ja koko solumäärä voidaan visualisoida histogrammeissa. Vaikka propidiumjodidi on spesifinen markkeri nukleoituneille soluille, autofluoresenssia voidaan käyttää alueiden rajaamisessa F-solujen laskennassa [22].
- Mitatessasi **värjättyä näytettä, jossa on korkea valkosoluarvo**, säädä FL3 - FL1-kompensointia siten, että (värjätty) punasolut FL1-akselilla osuvat enimmäkseen ensimmäiselle kymmenelle FL3-akselilla, mutta ilman että > 1% punasoluista osuu FL1-signaalin perustasolle.
- Aseta punaisten verisolujen ympärille rajausalue, **lukuun ottamatta punasolujen aggregaatteja**, solujätteitä ja nukleoituneita soluja (propidiumjodidiposiitiviset tapahtumat). Varmista, että yhden parametrin histogrammi perustuu tälle rajaukselle (G1 = R1). Aseta analyysialueet aikuisten punasoluille, aikuisten F-soluille ja sikiön punasoluille (katso alueiden säätö alla) anti-HbF-parametrin yhden parametrin histogrammiin.
- Nimeä ja tallenna instrumenttiasetukset ja protokollamalli, ja keräysprotokolla asetetaan keräämään vähintään 100.000 tapahtumaa luettelotiedostoon, jossa on kaikki parametrit (FS, SS, FL1, FL2 ja FL3).

Listmode –tiedostanalyysi

Luettelotilan tiedostojen analysointi tulisi suorittaa yllä olevien histogrammien mukaisesti. Rajausaluetta tulisi käyttää nukleoituneiden solujen poissulkemiseksi analyysistä, jonka tulisi suositellusti olla sivusironna (side scatter) vs. propidiumjodidikaavio. Lisäksi rajausstrategioihin tulisi sisältyä keino sulkea RBC-aggregaatit analyysistä käyttämällä FALS vs Side Scatter -porttia. Liiallinen RBC-aggregaatti (> 1%) voi aiheuttaa merkittävän sikiön RBC-prosenttiosuuden yliparantoinnin, koska aggregaatit aiheuttavat todellisen nimittäjän alilaskemisen. Kuten edellä on esitetty, on myös suositeltavaa, että analyysialueet luodaan anti-HbF:n yhden parametrin kaavioon käyttäen kolmea aluetta, jotka vastaavat aikuisten punasoluja, aikuisten F-soluja ja sikiön punasoluja. Analyysiohjelmiston minkä tahansa automaattisen skaalaustoiminnon poistaminen käytöstä antaa sikiön punasolujen populaation paremman visualisoinnin. Vaihtoehtoisesti kaksi-parametrinen anti-HbF-ilmentymisen ja autofluoresenssin kaavio voi myös olla tehokas tapa määrittellä sikiön punasolujen tunnistamisen alue. Konsensusmenetelmää alueiden asettamiseksi aikuisten punasoluille ja aikuisten F-soluille ei ole vahvistettu, vaikka olemme ehdottaneet autofluoresenssisignaalin käyttöä lähestymistapana [23]. Sikiön punasoluanalyysialue tulisi asettaa ensin käyttämällä kontrollinäytteitä, jotta analyysialue voidaan asettaa sikiön punasolupiikin kummallekin puolelle korkean kontrollinäytteen kohdalla (tyypillisesti 1-2% sikiön punasoluja).



Kuva 1. Data-analyysiin tulisi sisältyä alueet punasoluaggregaattien (P1-alue) ja nukleoituneiden solujen (P3-alue) poissulkemiseksi, sitten aikuisten punasolujen (P4-alue), aikuisten F-solujen (haluttaessa P5-alue) ja sikiön punasolujen (P6) määrittämisen alue).

Määrittelyn Laadunvalvonta

On välttämätöntä käyttää monitasoisia testattuja kontrollinäytteitä sekä menettelyn että analyysin arvioimiseen. Alhainen värjäytymisintensiteetti, fiksaatio- ja/tai permeabilisaatioliuosten väärästä konsentraatiosta johtuvat soluvauriot, lisääntyneet F-solutasot sekä väärä kompensointi ja epäoptimaalinen aluerajaus voivat vaikuttaa suuresti tuotettujen tulosten oikeellisuuteen. Laadunvalvontanäytteitä on kaksi päälähdettä:

- FETALTrol™** – Stabiiloitu verenkontrollituote on kätevä vaihtoehto "home brew" -kontrolleille. Se sisältää negatiivisia, matalan tason (~ 0,15% sikiön punasoluja) ja korkean tason (~ 1,5% sikiön punasoluja) positiivisia kontrolleja ja sen säilyvyysaika on 3 kuukautta. Tätä tuotetta käytetään kuten kokoverta tässä menettelyssä, ja Yhdysvaltain FDA hyväksynyt sen in vitro -diagnostisena kontrollina.
- "Home brew" tai talon sisäisesti valmistetut verinäytteet, joihin on lisätty sikiön punasoluja** – ABO-yhteensopivat sikiön tai napanuoran ja aikuisen veren sekoitukset. Ihannetapauksessa sikiön punasoluille tulisi olla korkeat, matalat ja negatiiviset kontrollit, joiden arvot ovat validoituja.

Käsittely ja Varastointi

Säilytä FMH QuikQuant™ antibody reagent pulloja pystyasennossa, tiiviisti suljettuna, 2-8 °C:ssa, kun niitä ei käytetä. Säilytä *Intra-Cell™* -konsentraattia pystyasennossa, tiiviisti suljettuna, huoneenlämmössä. Vältä kaikkien reagenssien tarpeetonta lämpenemisen ja jäähtymisen sykliä. Suojaa tuote jäätymiseltä, yli 30 °C:n lämpötilalta ja pitkältä ajalta huoneenlämmössä (18-25 °C), lukuun ottamatta *Intra-Cell™* -konsentraattia, tai valolle altistumiselta. Säilytä FMH QuikQuant™ buffer solution concentrate pystyasennossa ja huoneenlämmössä (18-25 °C). Annettujen säilytysohjeiden mukaisesti varastoidut reagenssit ovat stabiileja etiketissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

Varoitus

FMH QuikQuant™ antibody reagent ja FMH QuikQuant™ buffer solution sisältävät natriumatsidia (< 0,1% w / v). Tämä kemikaali on myrkyllinen ja vaarallinen yhdiste yhdistettynä happojen tai metallien kanssa. Käsittele huolellisesti. Natriumatsidia sisältävät liuokset on hävitettävä asianmukaisesti. FMH QuikQuant™ Intra-Cell™ -permeabilisointiliuos sisältää myrkyllistä Triton-X 100 -reagenssia, jota tulee käsitellä hyvien laboratoriokäytäntöjen mukaisesti ja asianmukaisia varotoimia noudattaen. Vältä aineen joutumista iholle tai silmiin ja päästämistä ympäristöön. On suositeltavaa noudattaa virtausytometrin valmistajan suosittelamia sisäisiä menettelyjä sen jälkeen, kun mittauksessa on käytetty propidiumjodidia. Yksityiskohtaisia tietoja on käyttöturvallisuustiedotteessa osoitteessa www.iqproducts.nl. Ota huomioon tämän pakettin käyttäjien velvollisuus ilmoittaa valmistajalle ja nimetyille viranomaisille tätä tuotetta koskevista tapauksista.

Valmistuksen Laadunvalvonta

Tämän paketin sisältämien reagenssien suorituskyky ja spesifisyys testataan IQ-tuotteen sisäisillä laadunvalvontamenetelmillä. Tämän tuotteen valmistuksessa käytetään laatuvarmistusta ja valmistusohjeita FDA QSR:n ja EN ISO 13485:n mukaisesti.

Tuoterajoitukset

Seuraavat kliiniset olosuhteet voivat johtaa lisääntyneeseen HbF-tasoon aikuisten F-solujen kohonneiden tasojen vuoksi, eikä niitä pidä sekoittaa sikiön verenvuotoon [22-24]:

- Vaikea anemia
- HbF:n perinnöllinen pysyvyys
- Talassemia
- Sirppisoluanemia, erityisesti hoidettaessa hydroksiureaa, butyraattia tai muita HbF-arvoa kohottavilla lääkkeillä

Mahdolliset Puutteet

- Riittämätön värjäytyminen ja huono erottelukyky ovat yleensä seurausta väärästä fiksaatiosta ja / tai permeabilisaatiosta. Glutaarialdehydi on varastoitava oikein ja laimennettava juuri ennen käyttöä fiksaatiovaiheessa. Jos glutaarialdehydi ei ole kiinnittänyt soluja riittävästi, ne hajoavat, kun *Intra-Cell™* lisätään. Jos *Intra-Cell™* -vaihetta ei suoriteta kunnolla, konjugoitu HbF-vasta-aine ei pysty saavuttamaan tavoitettua solussa [24].
- Laitteen asetus- tai kompensointiasetuksia ei ole optimoitu.
- Rajausalueen käyttämättä jättäminen sikiösolujen määrittämiseen positiivisen kontrollin perusteella, kuten FETALtrol™.
- Huono sekoittaminen ja/tai glutaarialdehydin käyttö, jonka pitoisuus on optimaalista korkeampi, voi aiheuttaa aggregaatteja, mikä havaitaan usein solujen pakkautumisen ja FETALtrol™ -näytteiden odotettua korkeammilla tuloksilla.
- 10-kertaisen *Intra-Cell™* solusisäisen permeabilisaatioliuoksen konsentraatin laimentamatta jättäminen aiheuttaa kasautumista tai agglutinaatiota (samankaltaisuus kuin kylmillä agglutiniineilla tai "rouleaux"), mikä vaikuttaa haitallisesti saatujen arvojen tarkkuuteen.
- Suodattamattomat liuokset voivat sisältää mikrohiukkasia, jotka laite 'näkee' ja laskee. Tämä voi vähentää käyttökelpoisten tapahtumien (punasolut) määrää kokonaismäärässä ja tehdä analyysistä vaikeaa tai vaikuttaa haitallisesti saatujen arvojen tarkkuuteen.
- Transfuusion jälkeisissä näytteissä immunologisesti välitetyt soluaggregaatit voivat antaa tulokseksi väärin koholla olevia sikiösoluarvoja. Tämä ongelma voidaan välttää sulkemalla pois aggregaatit.
- Autofluoresoivien nukleoituneiden solujen poissulkemisen epäonnistuminen data- analyysin aikana voi antaa valheellisen korkean sikiön punasolujen arvon.

Odotetut Arvot ja Niiden Johtaminen

Jokaisen laboratorion tulisi määrittää hyväksyttävä vertailualue (t) fetomaterinaalisille vuototesteille. Terveiden ei-raskaana olevien verinäytteiden sikiön punasolujen tulosten laboratorion keskiarvon oletetaan olevan $\leq 0,06\%$. Aikuisten F-solutasojen ei yleensä ilmoiteta, mutta kirjallisuuden mukaan suurin osa näytteistä on < 5% F-soluja [25]. Normaalieja, ilmeisesti terveitä laboratorioluovuttajia tutkittiin kolmessa paikassa. Näiden tulosten tulisi toimia suuntaviivoina. Jokaisen laboratorion on määritettävä omat vertailualueensa.

Suorituskykyominaisuudet

Talon sisäiset tutkimustulokset osoittivat, että HbF: tä vastaan suunnattu vasta-aine sitoutuu spesifisesti sikiön hemoglobiiniin eikä tunnista aikuisen hemoglobiinia.

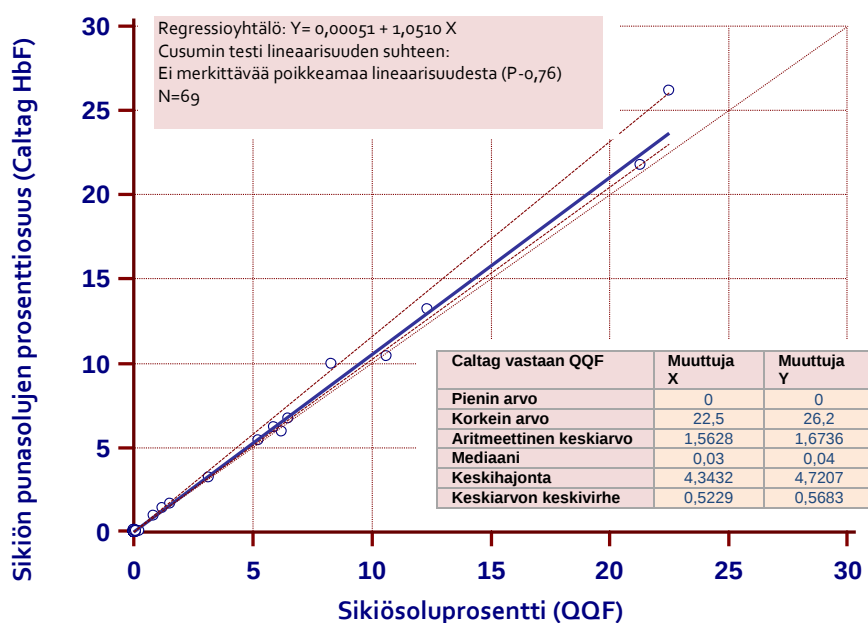
Taulukko 1. Herkkyystudkimustiedot FMH QuikQuant™. Metodien herkkyyden määrittäminen suoritettiin FETALtrol™ -seosten (korkeat, matalat ja negatiiviset tasot) laimennustutkimuksilla, joita seurasivat toistetut mittaukset Becton Dickinson FACScan -laitteella. Näytteet, joissa sikiön punasolut ovat vain 0,04%, voidaan erottaa merkittävästi ($P < 0,05$) näytteistä, joista puuttuu sikiösoluja.

Odotetut sikiön punasolujen prosenttiosuudet	Toisto 1	Toisto 2	Keskiarvo	Std Dev	CV	P Arvo
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

Taulukko 2. Tarkkuustutkimustiedot FMH QuikQuant™. Metodin epätarkkuuden määrittäminen suoritettiin tutkimalla FETALtrol™ -seksia, mitä seurasi toistetut mittaukset Becton Dickinson FACScan -laitteella. Näytteissä, joiden sikiön punasolut ovat vain 0,17%, variaatiokerroin (CV) on < 5%.

Toisto	Näyte 1	Näyte 2	Näyte	Näyte	Näyte 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
Keskiarvo	0.02	0.17	0.70	0.80	1.71
Std Dev	0.01	0.01	0.02	0.03	0.02
CV	33.3%	4.1%	3.4%	3.3%	1.2%



Kuva 2. FMH QuikQuant™ ei osoita merkittävää poikkeamaa lineaarisuudesta. Määrityksen lineaarisuuden määrittäminen suoritettiin Passing & Bablok-regressiolla sikiön punasolu-prosenttiosuuden välillä, joka määritettiin virtausytometrisillä Caltag Fetal Hgb- ja FMH QuikQuant™ (QQF) -määrityksillä.

Kliininen Arviointi:

Tulokset 74 ja 56 kliinisen näytteen testaamisesta kahdessa eri paikassa suorituskyvyn arviointitutkimuksen aikana ovat osoittaneet, että korrelaatio Kleihauer Betke -testin ja FMH QuikQuant™:n välillä oli erinomainen ($r^2 = 0,968$ ja $r^2 = 0,998$). Kirjallisuus vahvistaa tämän korrelaation ja toteaa, että FMH QuikQuant™ on tarkempi menetelmä KB-metodin FMH:n yliarviomisesta johtuen [27-28]. Kliinisen suorituskyvyn taustadatan voi pyytää osoitteesta marketing@iqproducts.nl.

Lainsäädännön Tila

Tällä hetkellä FMH QuikQuant™ on rekisteröity "in vitro -diagnostiikkalaitteeksi" Australiassa, Sveitsissä, Perussa, Isossa-Britanniassa ja Euroopan yhteisöön kuuluvissa maissa. Kaikissa muissa maissa se tulisi merkitä "vain tutkimuskäyttöön". Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston sääntelyasemaa ei ole vielä määritetty.

References

- 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 Mundee 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.
- 27 Corcoran D, Murphy D, Donnelly JC, Ainle FN. The prevalence of maternal F cells in a pregnant population and potential overestimation of foeto-maternal haemorrhage as a consequence. *Blood Transfus.* 2014 Oct;12(4):570-4.
- 28 Pastoret C, Le Priol J, Fest T, Roussel Evaluation of FMH QuikQuant for the detection and quantification of fetomaternal hemorrhage. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Jan- Feb;84(1):37-43.

Takuu

Tässä myydyille tuotteille voidaan taata vain etiketissä ilmoitettu määrä ja sisältö, kun ne toimitetaan asiakkaalle. Ei ole suoria tai epäsuoria takuita, jotka ylittäisivät tuotteen etiketissä olevan kuvauksen. IQ Products BV ei ole vastuussa tuotteen aiheuttamista omaisuusvahingoista, henkilövahingoista tai taloudellisista menetyksistä.

käytetyistä Symboleista [26]

	Katso käyttöohjeet
	Luettelonumero
	Riittää
	In vitro -diagnostinen lääkinällinen laite
	Varoitus, katso saateasiakirja
	Suojaa (auringon) valolta
	Biologiset riskit
	Lämpötilarajoitus (°C)
	Ainoastaan tutkimukseen
	Eränumero
	Käytä päivämäärään mennessä yyyy-mm-dd
	Valmistaja
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä

Yhteystiedot** IQ Products BV**

www.iqproducts.nl
 Rozenburglaan 13a
 9727 DL Groningen
 The Netherlands

 +31 (0)50 5757000

 Tekninen marketing@iqproducts.nl

 Tilauksia orders@iqproducts.nl
www.iqproducts.nl

Current version + release date	Version 5 November 2025
Previous version	Version 4
Changes	1. re-arranged information on front page 2. added Basic UDI-DI on front page 3. the CE symbol is no longer shown in italics 4. added "containing 1.0% Triton-X 100 WARNING" to section Product components – Intracell 5. removed CE from table with Explanation of used symbols 6. added information on Reference number, regulatory symbol, number of tests and IFU on first page of each language. 7. added warning on presence of Triton X-100 in the <i>Intra-Cell</i> permeabilization solution 8. corrected FDA QMS to QMSR and ISO 13485 towards ISO 13485:2016
Justification	1. Increase readability 2. IVDR 2017/746 requirements 3. in response to a non-conformity raised by the notified body 4. in response to the CLP analysis performed for the IVDR Technical Documentation. 5. CE is not a symbol, but a abbreviation 6. making basic information better available for the user 7. in response to the CLP analysis performed for the IVDR Technical Documentation 8. updated standards
Current version + release date	Version 4 22-01-2025 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 3
Changes	1. Added the sentence "It is recommended to follow the internal procedure advised by the flow cytometer manufacturer after using PI in measurement." to the Warning session. 2. UDI-DI on front page was corrected 3. UDI info at first page of translations was removed. 4. Fax number was removed. 5. Exchanged Intended Use in Portuguese and Spanish translation.
Justification	1. As response to comment on accumulation of Propidium Iodide in drain. 2. The last part of the shown code (QQF-110N8) was not correct. 3. Information already on front page, therefore not required here. 4. The fax is no longer used. 5. The Portuguese Intended Use was included in the Spanish translation and vice versa.
Current version + release date	Version 3 29-03-2023 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 2
Changes	• Removed sentence about IVD registration on page 1, 10, 18 and 26. • Added Switerland and Peru as IVD registered countries
Justification	• This sentence should have been deleted with expanding the part about regulatory status in the previous version. • Complete information.
Previous version + release date	Version 2 20-02-2023 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 1
Changes	Added Australia and United Kingdom as countries where the FMH QuikQuant has been registered as IVD product.
Justification	This information was missing and is useful for users in these countries.
Previous version + release date	Version 1 01-09-2021 (DD-MM-YYYY)
Previous version	N/A
Changes	1. Created this online version with translations of the international booklet which is printed and included with every kit. The online version includes Portuguese, Spanish and Finnish, whereas the international booklet includes English, French and German.
Justification	1. Environmental reasons.