

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

25 testów | Nr kat. ED7750

IVD **CE** ₂₂₆₅

Instrukcja użycia (PL)

Wersja: ED7750_IFU_v2_PL

Data wydania: 25.10.2024 r.

Symbole stosowane w oznakowaniu urządzeń

IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Ograniczenie temperatury
CE ₂₂₆₅	Znak zgodności CE Numer identyfikacyjny organu notyfikowanego		Przechowywać poza zasięgiem światła słonecznego
	Producent		Utrzymywać w suchości Chronić przed deszczem
UDI	Unikalny identyfikator urządzenia		Ostrzeżenie
	Zapoznaj się z instrukcją użycia		Nie używać ponownie
	Zawiera ilość wystarczającą na <n> testów	TUBE	Zawiera <n> próbek do testu jednorazowego użytku
REF	Numer katalogowy	CONC 10x	Skoncentrowany roztwór (10x)
LOT	Kod partii	CONTENTS	Zawartość
	Termin przydatności do użycia	UK CA	Znak UKCA

1. Przeznaczenie

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit jest przeznaczony do wykrywania z dużą czułością i oznaczania liczby komórek z niedoborem glikozylo-fosfatydylo-inozytolu (GPI) w ludzkiej krwi pełnej za pomocą cytometrii przepływowej.

Co jest wykrywane i/lub mierzone

Urządzenie DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit wykrywa i zlicza komórki z niedoborem glikozylo-fosfatydylo-inozytolu (GPI) (klony PNH) jako procent:

- Komórek CD59 dim lub CD59- ze wszystkich erytrocytów (CD235a+)
- Komórek CD59 dim lub CD59- ze wszystkich iRBCs (CD235a+CD71+)
- Komórek CD14-, CD157- i zakotwiczonych w GPI ze wszystkich monocytów (CD45+CD64+)
- Komórek CD24-, CD157- i i zakotwiczonych w GPI ze wszystkich granulocytów obojętnochłonnych (CD45+CD15+)

Funkcja urządzenia

Urządzenie przeznaczone jest do diagnozowania i monitorowania pacjentów cierpiących lub podejrzewanych o napadową nocną hemoglobinurię (PNH) i zaburzenia pokrewne ⁽¹⁾.

Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego

Napadowa nocna hemoglobinuria (PNH) jest rzadkim zaburzeniem hematopoetycznym komórek macierzystych, które jest konsekwencją niezłośliwego klonalnego namnażania się komórek z somatyczną mutacją genu PIGA (ang. Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class A). Mutacje genu PIGA skutkują niezdolnością do ekspresji białek powierzchniowych komórek zakotwiczonych w glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI).

Urządzenie jest przeznaczone do wykrywania granulocytów obojętnochłonnych i monocytów z niedoborem GPI ⁽¹⁾ oraz erytrocytów z całkowitym (Typ III) i częściowym (Typ II) niedoborem GPI ^(2,3,4,5,6) w celu oceny wielkości klonu PNH.

Ponadto urządzenie wykrywa iRBCs z niedoborem GPI (niedojrzałe erytrocyty) u pacjentów poddawanych transfuzji krwi, gdy erytrocyty PNH są trudne do określenia ⁽⁷⁾.

Rodzaj testu

Nie zautomatyzowany

Ilościowy

Wymagany rodzaj próbki

Próbka ludzkiej pełnej krwi obwodowej z antykoagulantem (EDTA, heparyna, cytrynian) ⁽¹⁾

Populacja testowa

Pacjenci z:

- laboratoryjnymi markerami hemolizy, gdy wykluczono inne, częstsze przyczyny hemolizy,
- niewyjaśnionymi zakrzepami w młodym wieku,
- stwierdzoną zakrzepicą w nietypowym miejscu,
- wrodzoną lub nabytą niedokrwistością aplastyczną (AA),
- zespołem mielodysplastycznym (MDS),
- niewyjaśnioną cytopenią, w przypadku której AA lub MDS stanowią diagnostykę różnicową ⁽¹⁾

2. Użytkownik

Urządzenie jest przeznaczone wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego. Nie do badań przyłóżkowych ani nie do samodzielnego wykonywania testów.

Wymagania dotyczące kwalifikacji

Docelowy użytkownik powinien posiadać najnowoszą wiedzę specjalistyczną w zakresie analizy cytometrii przepływowej komórek ludzkich, standardowych technik laboratoryjnych, w tym umiejętności pipetowania oraz bezpiecznego i właściwego obchodzenia się z próbkami pobranymi z organizmu ludzkiego.

Docelowy użytkownik musi przestrzegać normy EN ISO 15189 lub innych norm krajowych jeśli takowe istnieją.

3. Zasada testu

Zasada testu opiera się na wykrywaniu kotwicy GPI i białek zakotwiczonych w GPI na powierzchni ludzkich komórek krwi. Zastosowane w teście przeciwciała monoklonalne i rekombinowana proaerolizyna są znakowane różnymi fluorochromami, które są wzbudzane wiązką laserową z cytometru przepływowego podczas pobierania wybarwionej próbki krwi. Późniejsza fluorescencja (emisja światła) każdego fluorochromu obecnego w pobranej komórce krwi jest zbierana i analizowana przez urządzenie. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do gęstości ekspresji antygenu w komórce, co pozwala na rozdzielenie różnych podzbiorów komórek.

4. Dostarczone odczynniki

Zawartość

Urządzenie DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, wystarczające do zbadania 25 pacjentów, dostarczane jest z następującymi odczynnikami:

PNH High-Sensitivity Assay (25 woreczków). Każdy woreczek składa się z 1 jednorazowej próbówki z korkiem oznaczonej kolorem (cyjanowy pasek)

PNH WBC 7-color (ED7750-1) i 1 jednorazowej kolorowej probówki z korkiem oznaczonej kolorem (czerwony pasek) **PNH RBC 3-color** (ED7750-2), zawierających wstępnie zmieszane kombinacje odczynników znakowanych fluorochromem, wysuszonych ze składnikami stabilizującymi jako warstwą na dnie probówek (12 x 75 mm), patrz tabela 1 i 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 butelka) zawierający 15 ml stężonego (10X) roztworu buforowego na bazie formaldehydu.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 woreczek) zawierający 10 zakorkowanych probówek jednorazowego użytku, z których każda zawiera pojedynczy odczynnik znakowany fluorochromem wysuszony ze składnikami stabilizującymi jako warstwą na dnie probówki (12 x 75 mm).

UWAGA: zestaw kompensacji PNH jest przeznaczony wyłącznie do konfiguracji kompensacji. Pojedyncze odczynniki znakowane fluorochromem (patrz tabela 1 i tabela 2) umożliwiają łatwą i dokładną procedurę kompensacji.

Skład

Tabela 1 Opis składników aktywnych PNH WBC 7-color

Antygen	Fluorochrom	Klon	Izotyp
Kotwica GPI (proaerolizyna)	Alexa Fluor®488	Nie dotyczy	Nie dotyczy
CD157	PE	SY11B5	IgG1
CD45	PerCP-Cy™5.5	2D1	IgG1
CD64	PE-Cy™7	10.1	IgG1
CD24	APC	SN3	IgG1
CD14	APC-Cy™7	MEM-15	IgG1
CD15	Pacific Blue™	MEM-158	IgM

Tabela 2 Opis składników aktywnych PNH RBC 3-color

Antygen	Fluorochrom	Klon	Izotyp
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Materiały wymagane, nie będące w zestawie

Woda dejonizowana (do odczynników)

Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (1X PBS), pH 7,2 – 7,4

Cząstki kompensacyjne cytometrii przepływowej (zestaw SpheroTech SPHERO™ COMPTrol, nr kat. CMLgP-50-3K lub równoważne cząstki kompensacyjne)

6. Wymagany osprzęt

Pipeta automatyczna z jednorazowymi końcówkami (100 µl – 5 ml) do pipetowania próbek i odczynników

Dozownik lub pipeta do płynów z jednorazowymi końcówkami (2 ml) do dozowania roztworu do lizy erytrocytów

Mieszadło wirowe

Stożkowe polipropylenowe probówki wirówkowe (15 ml lub 50 ml) do przygotowania próbek

Wirówka z odpowiednimi adapterami rotora do probówek okrągłodennych 12 x 75 mm

Cytometr przepływowy z trzema laserowymi źródłami wzbudzenia (488 nm, ~635 nm i 405 nm), detektorami rozpraszania, filtrami optycznymi i detektorami emisji odpowiednimi do zbierania sygnałów z fluorochromów przedstawionych w tabeli 3

Tabela 3 Charakterystyka widmowa fluorochromów zastosowanych w urządzeniu

Fluorochrom	Wzbudzenie [nm]	Emisja [nm]
Alexa Fluor® 488	488	520
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP-Cy™5.5	488	695
PE-Cy™7	488	780
APC	630 – 640	660
APC-Cy™7	630 – 640	780
Pacific Blue™	405	455

UWAGA: urządzenie zostało przetestowane na cytometrach przepływowych BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEx (Beckman Coulter).

7. Przechowywanie

Przechowywać w temperaturze 20–30°C.

Unikać długotrwałej ekspozycji na światło.

Utrzymywać w suchości.

UWAGA: produkt wrażliwy na wilgoć. Nie otwierać woreczka foliowego przed pierwszym użyciem.

Informacje na temat warunków przechowywania i stabilności roztworów roboczych (w stosownych przypadkach) znajdują się w punkcie 10. Procedura (Przygotowanie dostarczonych odczynników).

8. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia użytkowania

Klasyfikacja zagrożeń GHS

OSTRZEŻENIE: Lysing solution (ED7750-3) zawiera formaldehyd (nr CAS 50-00-0) i metanol (nr CAS 67-56-1) w stężeniach sklasyfikowanych jako niebezpieczne.

Elementy etykiety	Hasło ostrzegawcze
	Niebezpieczeństwo
	
Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia	H315: Działa drażniąco na skórę. H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H319: Działa drażniąco na oczy. H335: Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. H341: Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne. H350: Może powodować raka. H371: Może powodować uszkodzenie narządów. H373: Może powodować uszkodzenie nerek w przypadku długotrwałego lub powtarzanego narażenia po połknięciu. H302+H312+H332: Działa szkodliwie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania.
Zwroty wskazujące środki ostrożności	P201: Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi instrukcjami. P260: Nie wdychać oparów. P264: Dokładnie umyć ręce i odsonięte części ciała po użyciu. P280: Stosować rękawice ochronne/ochronę oczu/ochronę twarzy. P301+P312: W PRZYPADKU POŁKNIECIA: W przypadku złego

	samopoczucia skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P302+P352: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. P305+P351+P338: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeśli są i można to łatwo zrobić. Kontynuować płukanie. P308+P313: W przypadku narażenia lub styczości: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P314: W przypadku złego samopoczucia zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P333+P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362+P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.
--	--

Zapoznaj się z kartą charakterystyki (SDS) dostępną na stronie produktu pod adresem www.exbio.cz, aby uzyskać pełne informacje na temat zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne i mieszaniny zawarte w produkcie oraz jak należy się z nimi obchodzić i jak je utylizować.

Zagrożenie biologiczne

Ludzkie próbki biologiczne i próbki krwi oraz wszelkie materiały mające z nimi kontakt są zawsze uważane za materiały zakaźne.

Stosować środki ochrony osobistej i bezpieczeństwa, aby uniknąć kontaktu ze skórą, oczami i błonami śluzowymi.

Postępuj zgodnie ze wszystkimi obowiązującymi przepisami prawa, regulacjami i procedurami dotyczącymi obchodzenia się z materiałami zakaźnymi i ich usuwania.

Oznaki pogorszenia jakości

Normalny wygląd dostarczonego odczynnika to przezroczysta wysuszona warstwa na dnie probówki. Nie używać odczynnika w przypadku zaobserwowania jakichkolwiek zmian w wyglądzie, na przykład obecności wilgoci wewnątrz probówki.

Ograniczenie użytkowania

Nie stosować po upływie daty ważności podanej na etykiecie produktu.

Nie używać ponownie probówek.

9. Próbką

Stosować żyłą krew obwodową pobraną do pojemnika na próbki sklasyfikowanego jako wyrób medyczny, z antykoagulantem EDTA, heparyną lub ACD (kwas cytrynowo-dekstrozowy) ⁽²⁾.

Używać wyłącznie próbki niepoddane obróbce. Nie używać wstępnie lizowanych, przemytych ani rozcieńczonych próbek.

Próbkę krwi należy poddać obróbce nie później niż 48 godziny po pobraniu. Próbkę przechowywać w temperaturze laboratoryjnej (20 – 25°C). Nie należy przechowywać próbki w lodówce.

Interferencja endogenna

Na podstawie badań literatury naukowej w Tabeli 4 przedstawiono endogenne źródła zakłóceń.

Tabela 4 Endogenna interferencja urządzenia

Interferencja endogenna	Wpływ	Odniesienie
Albumina	Albumina w dużych stężeniach może zakłócać wyniki testu ze względu na swoją zdolność wiązania i uwalniania dużych ilości ligandów.	9, 10, 26
Bilirubina (żółta) (niesprężona)	Bilirubina zwiększa tło fluorescencji komórek ze względu na swoją wysoką autofluorescencję.	13, 15, 19
Pozostałości komórek (po lizie)	Pozostałości komórek mogą powodować niedokładność pomiaru liczby komórek i zmniejszenie ilości przeciwciał w urządzeniu.	12, 16
Erytrocyty	Niewystarczająca liza, obecność czerwonych krwinek w próbce może skutkować błędnym liczeniem komórek.	17
Hemoglobina	Zhemolizowane próbki mogą dawać niewiarygodne wyniki.	14
Ludzkie przeciwciała przeciw mysim	Może to mieć wpływ na funkcjonalność urządzenia (zdolność wiązania się z antygenami na powierzchni komórki).	11, 21, 22, 23, 24, 25
Immunoglobuliny	Może to wpływać na liczbę podgrup limfocytów.	12
Czynniki reumatoidalne	Obecność czynnika reumatoidalnego zakłóca wyniki testów MIA (multipleksowych testów immunoenzymatycznych).	18
Trójglicerydy	Wysokie stężenie lipidów we krwi może mieć wpływ na wyniki analizy metodą cytometrii przepływowej niektórych populacji komórek krwi.	20

Zakłócenia egzogenne

Zgodnie z opublikowanymi pracami Sutherlanda i in. ⁽⁷⁾ czerwone krwinki pochodzące z transfuzji krwi stanowią główne źródło zakłóceń w analizie PNH u pacjentów z dużym klonem PNH doświadczających hemolizy pozanaczyniowej. Zdrowe erytrocyty otrzymane drogą transfuzji mają istotny wpływ na monitorowanie klonu PNH w linii czerwonych krwinek (RBC). Dodanie CD71 znacząco poprawia możliwość analizy rozmiarów klonów PNH w linii RBC, niezależnie od stanu hemolitycznego pacjenta i/lub statusu transfuzji. Urządzenie DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit rozwiązuje ten problem zgodnie z wcześniej wymienionymi wytycznymi, oferując antygen CD71 do identyfikacji niedojrzałych czerwonych krwinek (iRBC), przy czym iRBC dokonują również ekspresji zakotwiczonego w GPI antygenu CD59. W workach do transfuzji iRBC są zwykle obecne w bardzo małej ilości ⁽²⁷⁾. Z drugiej strony, u pacjentów doświadczających hemolizy pozanaczyniowej spowodowanej PNH liczba iRBCs jest zwiększona z powodu szybkiej utraty erytrocytów ⁽²⁸⁾. Dzięki dodaniu monoklonalnego przeciwciała CD71 do identyfikacji iRBC lekarz może dokładniej monitorować postęp PNH, zgłaszany jako utrata antygenu CD59 na iRBC, eliminując interferencję z egzogennymi RBC z worków transfuzyjnych. Zestaw DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit zawiera przeciwciała przeciwko ludzkiemu CD71 i pozwala na wykorzystanie najnowszych wytycznych dotyczących wykrywania i ilościowego oznaczania klonów PNH.

10.Procedura

Przygotowanie dostarczonych odczynników

PNH High-Sensitivity Assay

Nie jest wymagane żadne przygotowanie odczynników dostarczanych w probówkach, wyłącznie do jednorazowego użytku.

Lysing Solution

Przed użyciem należy doprowadzić odczynnik do temperatury pokojowej.

Odczynnik ma 10-krotne stężenie i przed użyciem należy go rozcieńczyć wodą dejonizowaną stosować (1 część stężonego roztworu na 9 części wody dejonizowanej). Po otwarciu odczynnik zachowuje swoje właściwości użytkowe do daty ważności, pod warunkiem przechowywania w podanych warunkach w oryginalnym opakowaniu podstawowym.

Rozcieńczony roztwór lizujący (1X) jest stabilny przez 1 miesiąc, jeśli jest przechowywany w dozowniku lub w zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej.

Przygotowanie wymaganych, a nie zawartych w zestawie materiałów

Cząsteczki kompensacyjne

Przygotować roztwór roboczy cząstek kompensacyjnych cytometrii przepływowej zgodnie z instrukcjami producenta.

Konfiguracja kompensacji

Uzyskaj próbki z zestawem kompensacyjnym przy użyciu tej samej konfiguracji cytometru przepływowego, przed analizą barwionych próbek PNH RBC 3-color i PNH WBC 7-color.

UWAGA: procedury konfiguracji kompensacji PNH RBC 3-color i PNH WBC 7-color różnią się rodzajem przygotowania próbki i barwieniem próbki.

Probówki kompensacyjne PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

1. Dodać zestaw SPHERO™ COMPtral Kit lub równoważne cząsteczki kompensacyjne na dno każdej jednokolorowej próbki kompensacyjnej.
2. Mieszać i inkubować przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
3. Dodać 4 ml 1X PBS do każdej próbki kompensacyjnej. Wirować przez 5 minut z prędkością 300×g.
4. Odrzucić ciecz sklarowaną nad osadem bez naruszania cząstek kompensacyjnych i dodać 0,1 ml 1X PBS do każdej próbki kompensacyjnej.
5. Ustawić napięcia na detektorach fluorescencji przed analizą wybarwionych próbek. Napięcie na detektorze PMT powinno być ustawione na tyle wysoko, aby jak najmniej zdarzeń wybarwionych ujemnie zakłócało kanał 0 na osi fluorescencji. Również napięcie detektora PMT nie powinno przekraczać wartości, przy których dodatnie zdarzenia są dociskane do prawej osi.
6. Natychmiast pobrać zabarwione próbki kompensacyjne za pomocą cytometru przepływowego.
7. Obliczyć macierz kompensacji PNH RBC 3-color w oprogramowaniu cytometrycznym opracowanym przez producenta lub w oprogramowaniu przeznaczonym do analizy danych z cytometrii offline. Użyć tej macierzy kompensacji dla wszystkich próbek z tej serii PNH RBC 3-color.

UWAGA: po dokonaniu ustawień dla określonej partii PNH RBC 3-color nie należy zmieniać ustawień detektorów fluorescencyjnych, aby zachować te same ustawienia akwizycji macierzy kompensacji i wyniki kompensacji.

Probówki kompensacyjne PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

1. Dodać 50 µl dejonizowanej wody na dno każdej jednokolorowej próbki kompensacyjnej i energicznie wirować przez 7-10 sekund.

2. Dodać 100 µl pełnej krwi obwodowej do każdej jednokolorowej próbówki kompensacyjnej i energicznie wymieszać.
3. Inkubować przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
4. Dodać 2 ml rozcieńczonego (1X) Lysing Solution do każdej próbówki kompensacyjnej.
5. Inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
6. Wirować przez 5 minut z prędkością 300×g, odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem i ponownie zawiesić osad komórek w 2 ml 1X PBS.
7. Wirować przez 5 minut z prędkością 300×g, odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem i ponownie zawiesić osad komórek w 0,2 ml 1X PBS.
8. Ustawić napięcia na detektorach fluorescencji przed analizą wybarwionych próbek. Napięcie na detektorze PMT powinno być ustawione na tyle wysoko, aby jak najmniej zdarzeń wybarwionych ujemnie zakłócało kanał 0 na osi fluorescencji. Również napięcie detektora PMT nie powinno przekraczać wartości, przy których dodatnie zdarzenia są dociskane do prawej osi.
9. Natychmiast pobrać zabarwione próbówki kompensacyjne za pomocą cytometru przepływowego.
10. Obliczmacierz kompensacji PNH WBC 7-color w oprogramowaniu cytometru opracowanym przez producenta lub w oprogramowaniu przeznaczonym do analizy danych cytometrii offline. Użyć tej macierzy kompensacji dla wszystkich próbek z tej serii PNH WBC 7-color.

UWAGA: po dokonaniu ustawień dla określonej partii PNH WBC 7-color nie należy zmieniać ustawień detektorów fluorescencyjnych, aby zachować te same ustawienia akwizycji macierzy kompensacji i wyniki kompensacji.

Przygotowanie próbki

Wykrywanie i różnicowanie klonów PNH w erytrocytach przy użyciu próbówki PNH RBC 3-color wymaga przygotowania próbki przed procedurą barwienia.

UWAGA: przed obróbką próbki należy upewnić się, że cytometr został prawidłowo ustawiony.

1. Polipropylenową próbówkę stożkową oznakować identyfikacją badanej próbki krwi.
2. Odpipetować 10 µl dobrze wymieszanej próbki krwi na dno oznaczonej próbówki stożkowej.
3. Rozcieńczyć próbkę krwi 1:100 z 1 ml 1X PBS i mieszać ręcznie, kołyszając przez 5 sekund.

UWAGA: w klasycznej postaci PNH dominuje hemoliza wewnątrznacyniowa. Przed rozcieńczeniem próbki krwi należy odnieść się do liczby RBC z analizatora hematologicznego w celu uzyskania liczby RBC w rozcieńczonej próbce krwi w zakresie $3 - 5 \times 10^7 / \text{ml}$ rozcieńczonej krwi i dostosować współczynnik rozcieńczenia zgodnie z wymaganiami w celu uzyskania wystarczającej liczby RBC w cytometrze przepływowym.

4. Natychmiast po rozcieńczeniu próbki przejść do procedury barwienia próbki.

Wykrywanie komórek z niedoborem GPI w granulocytach obojętnochłonnych i monocytach za pomocą próbki PNH WBC 7-color nie wymaga przygotowania preparatu przed procedurą barwienia.

Barwienie próbki – próbka PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

1. Oznaczyć próbkę PNH RBC 3-color danymi identyfikacyjnymi badanej próbki krwi.
2. Odpipetować 50 µl dobrze wymieszanej, rozcieńczonej próbki krwi na dno próbki PNH RBC 3-color.

UWAGA: unikać pipetowania krwi po ścianie próbki. Jeśli rozmaz lub kropla krwi pozostanie na ścianie próbki, nie zostanie ona zabarwiona odczynnikiem, przez co wyniki testu mogą być nieważne.

3. Energicznie wirować przez 7-10 sekund.
UWAGA: skrócenie czasu wirowania może wpłynąć na wyniki testu.
4. Inkubować próbkę PNH RBC 3-color przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
5. Dodać 4 ml 1X PBS do próbki PNH RBC 3-color.
6. Wirować próbkę PNH RBC 3-color przez 5 minut z prędkością 300×g.
7. Odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem bez naruszania osadu komórek i dodać 0,5 ml 1X PBS do próbki PNH RBC 3-color.
8. Krótco wirować, aby ponownie zawiesić osad komórkowy.

Pobrać wybarwioną próbkę za pomocą cytometru przepływowego. Jeśli zabarwiona próbka nie zostanie pobrana natychmiast, zakręcić próbkę i przechowywać w ciemności w temperaturze 2-8°C oraz poddać analizie w ciągu 2 godzin.

UWAGA: rozbić agregaty komórek w wybarwionej próbce, przesuwając próbkę testową po statywie próbek bezpośrednio przed akwizycją na cytometrze przepływowym. Nadmierna ilość agregatów RBC może wpływać na wyniki testu.

Barwienie preparatu – próbówka PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

1. Oznaczyć próbkę PNH WBC 7-color danymi identyfikacyjnymi badanej próbki krwi.
2. Dodać 50 µl wody dejonizowanej do próbówki PNH WBC 7-color. Energicznie wirować przez 7-10 sekund.

UWAGA: skrócenie czasu wirowania może wpłynąć na wyniki testu.

3. Odpipetować 100 µl dobrze wymieszanej próbki krwi na dno próbówki PNH WBC 7-color i energicznie wymieszać.

UWAGA: unikać pipetowania krwi po ściance próbówki. Jeśli rozmaz lub kropla krwi pozostanie na ściance próbówki, nie zostanie ona zabarwiona odczynnikiem, przez co wyniki testu mogą być nieważne.

4. Inkubować przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
5. Dodać 2 ml 1X roboczego roztworu do lizy erytrocytów do próbówki PNH WBC 7-color.
6. Inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
7. Wirować próbkę PNH WBC 7-color 5 minut z prędkością 300×g.
8. Odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem bez naruszania osadu komórek i dodać do próbówki 2 ml 1X PBS.
9. Wirować próbkę PNH WBC 7-color 5 minut z prędkością 300×g.
10. Odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem bez naruszania osadu komórek i dodać do próbówki 0,2 ml 1X PBS.
11. Krótko wirować, aby ponownie zawiesić osad komórkowy.

Pobrać wybarwioną próbkę za pomocą cytometru przepływowego. Jeśli zabarwiona próbka nie zostanie pobrana natychmiast, zakręcić próbkę i przechowywać w ciemności w temperaturze 2-8°C oraz poddać analizie w ciągu 24 godzin.

Analiza metodą cytometrii przepływowej

Cytometr przepływowy wybrany do użytku z urządzeniem DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit należy rutynowo kalibrować przy użyciu mikrokulek fluorescencyjnych, aby zapewnić stabilną czułość detektorów zgodnie z instrukcjami producenta cytometru.

W przypadku niewłaściwej konserwacji cytometr przepływowy może dawać fałszywe wyniki.

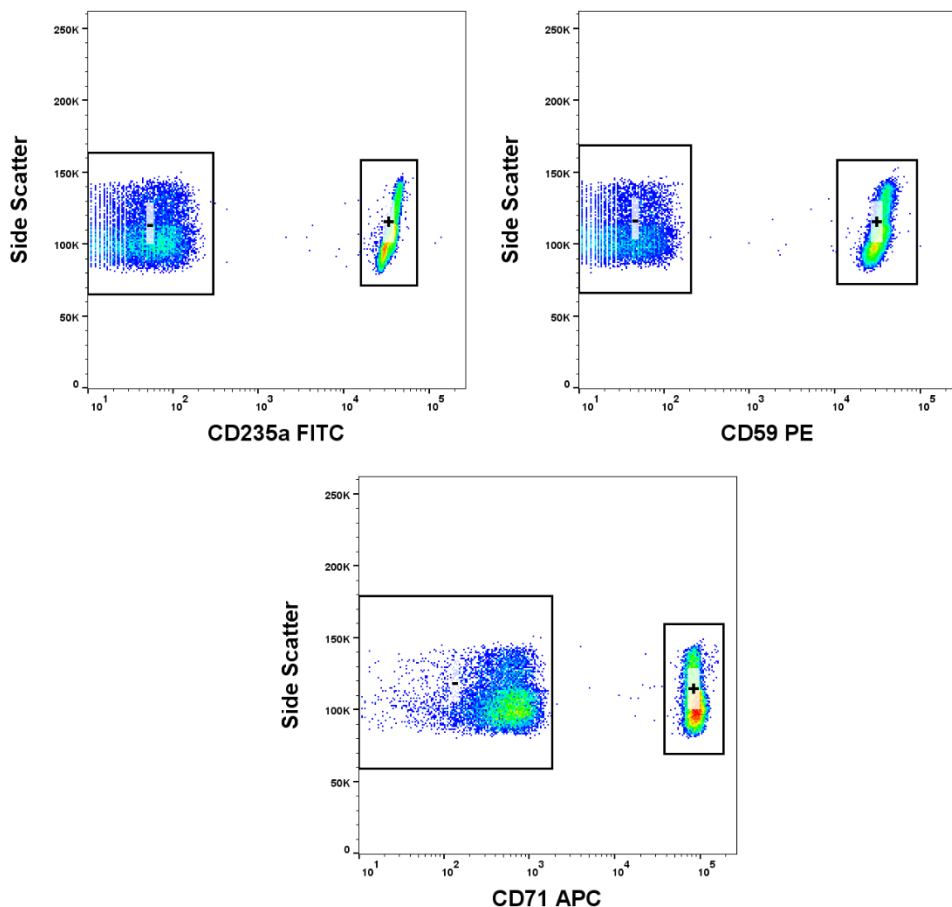
Patrz specyfikacje cytometru producenta dotyczące laserów i detektorów fluorescencyjnych zgodnie z charakterystyką wzbudzenia i emisji fluorochromów w rozdziale 6. Wymagany osprzęt.

Do analizy danych pomiarowych można wykorzystać oprogramowanie cytometryczne opracowane przez producenta lub oprogramowanie dedykowane do analizy danych cytometrycznych offline (np. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analiza probówek kompensacyjnych PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

Wizualizuj dane nieskompensowane dla każdej probówki kompensacyjnej na wykresie punktowym rozproszenia bocznego (SSC) w porównaniu z „fluorochromem do skompensowania”. Ustaw bramki dla dodatnich (+) i ujemnych (-) cząstek kompensacyjnych cytometrii, jak pokazano na rysunku 1.

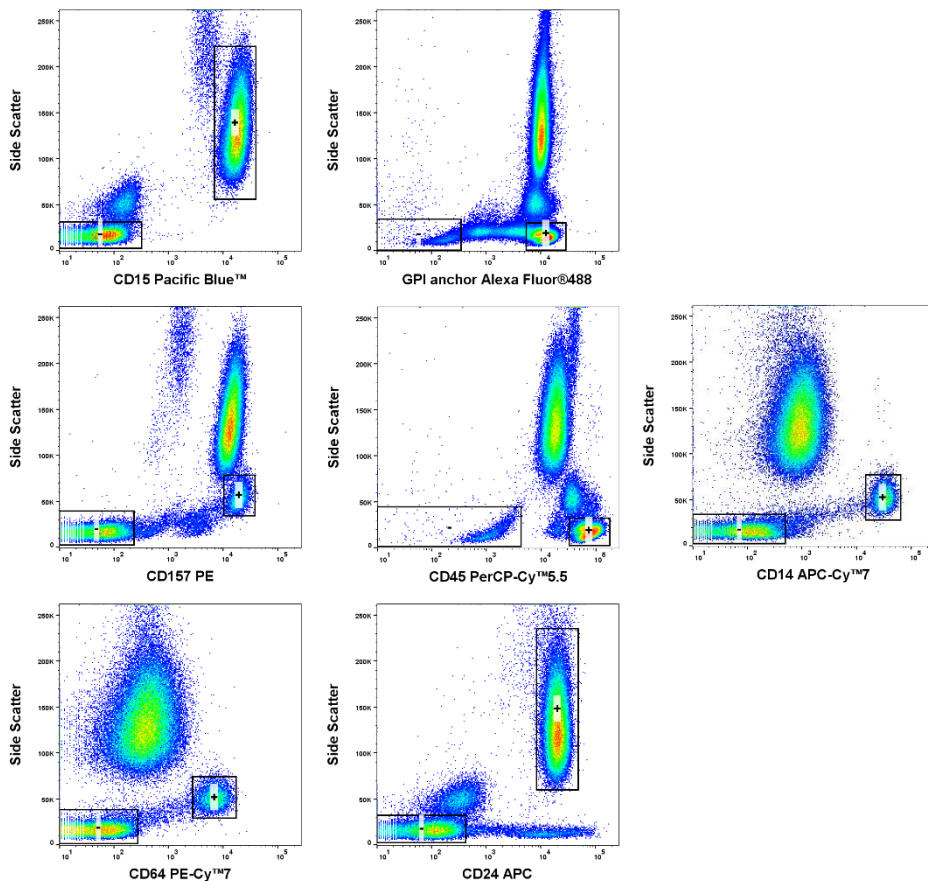
Rysunek 1 Identyfikacja dodatnich (+) i ujemnych (-) cytometrycznych cząstek kompensacyjnych w probówkach kompensacyjnych (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Analiza próbek kompensacyjnych PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

Wizualizuj dane nieskompensowane dla każdej próbki kompensacyjnej na wykresie punktowym rozproszenia bocznego (SSC) w porównaniu z „fluorochromem do skompensowania”. Ustaw bramki dla najbardziej pozytywnych (+) i najbardziej negatywnych (-) populacji, jak pokazano na rysunku 2.

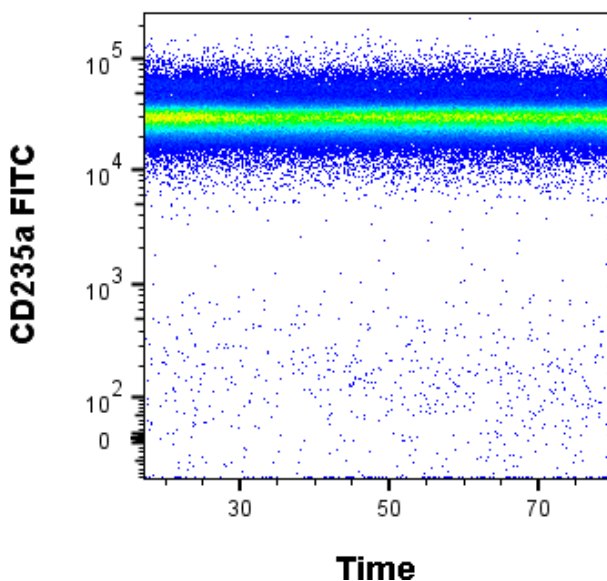
Rysunek 2 Identyfikacja najbardziej pozytywnych (+) i najbardziej negatywnych (-) zdarzeń w próbkach kompensacyjnych (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Probówka PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

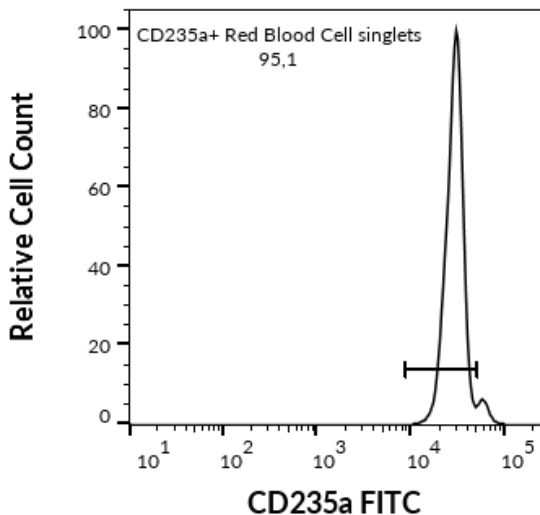
Ze względu na niską liczbę iRBCs w rozcieńczonej próbce krwi należy pobrać do analizy 500 000 – 1 500 000 zdarzeń erytrocytów. Akwizycja $\geq 500\,000$ zdarzeń skutkuje długimi czasami akwizycji. Może to wpływać na równowagę kompleksu wiążącego przeciwciało-antygen i powodować spadek fluorescencji CD235a FITC. Zawsze monitoruj stabilność intensywności fluorescencji w czasie akwizycji (rysunek 3).

Rysunek 3 Wszystkie uzyskane zdarzenia na wykresie punktowym CD235a FITC w funkcji czasu (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Wizualizuj skompensowane dane jako histogram, gdzie oś X przedstawia intensywność fluorescencji w kanale FITC. Ustaw bramkę „CD235a+ RBC singlets” (rysunek 4).

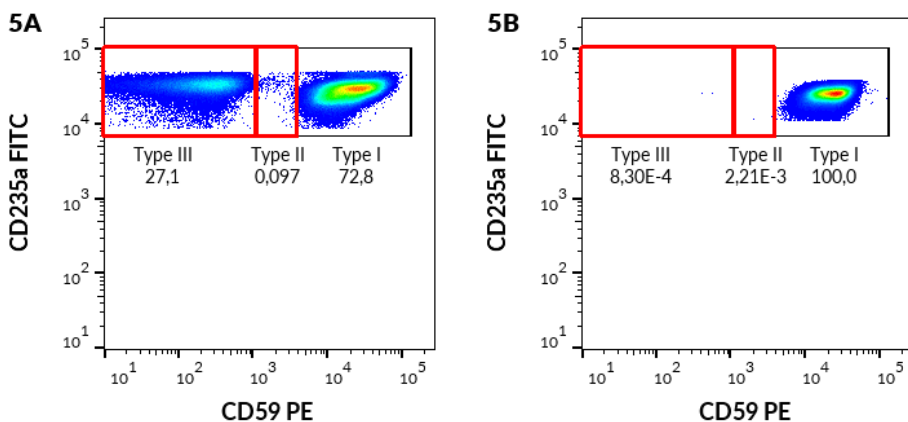
Rysunek 4 Wyznaczenie singletów CD235a+ RBC (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Erytrocyty

Wizualizuj singlety CD235a⁺ RBC na wykresie punktowym CD59 PE względem CD235a FITC. Podziel zdarzenia na trzy populacje za pomocą trzech odpowiednich bramek (rysunek 5) i oblicz odsetek zdarzeń w regionach Typu I, Typu II i Typu III.

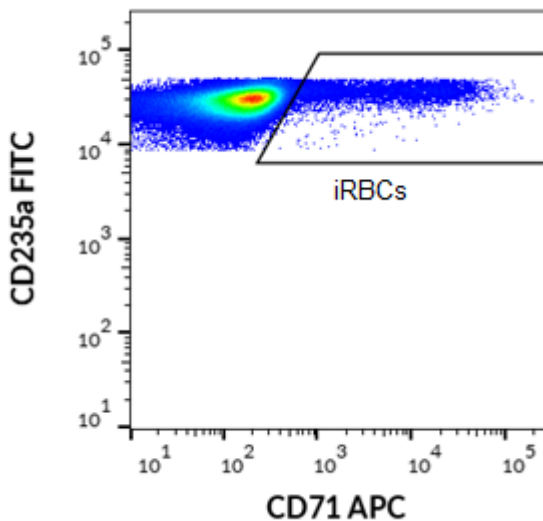
Rysunek 5 Singlety CD235a⁺ RBC na wykresie punktowym CD59 PE vs. CD235a FITC (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



iRBCs (niedojrzałe erytrocyty)

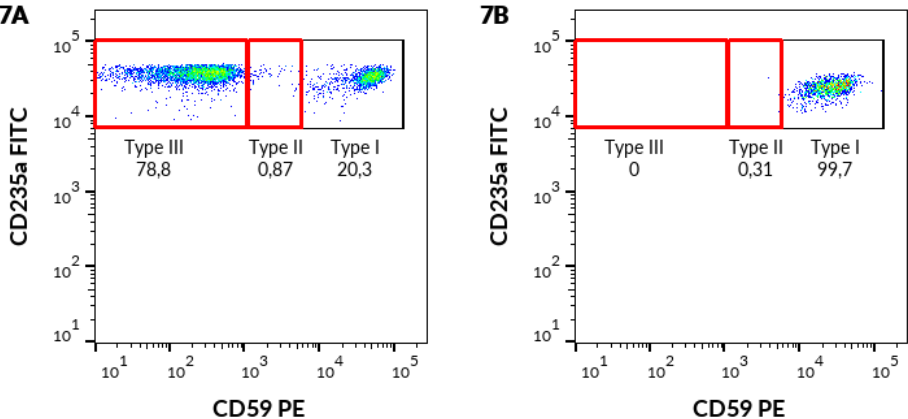
Wizualizuj singlety CD235a⁺ RBC za pomocą wykresu punktowego- CD71 APC w porównaniu z CD235a FITC i oddzielne iRBCs CD71⁺ (rys. 6).

Rysunek 6 Singlety CD235a⁺ RBC na wykresie punktowym CD71 APC vs. CD235a FITC. Wyznaczanie iRBCs CD71⁺ (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Wizualizuj iRBCs CD71+ na wykresie punktowym CD59 PE w porównaniu z CD235a FITC. Podziel zdarzenia na trzy populacje za pomocą trzech odpowiednich bramek (Rysunek 7) i oblicz odsetek zdarzeń w regionach Typu I, Typu II i Typu III.

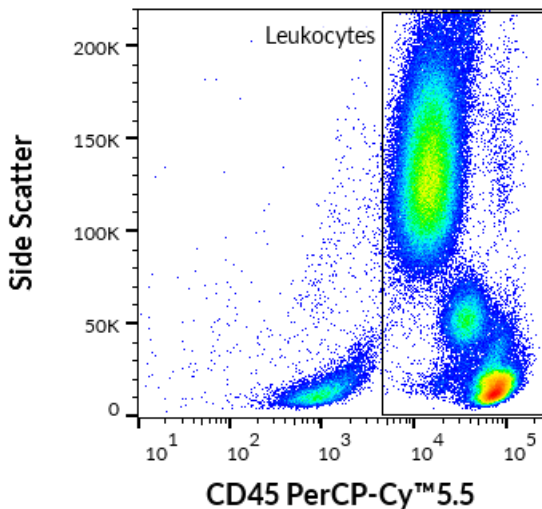
Rysunek 7 CD71+ iRBCs na wykresie punktowym CD59 PE vs. CD235a FITC (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Probówka PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

Uzyskaj co najmniej 200 000 zdarzeń do analizy. Wizualizuj skompensowane dane na wykresie punktowym rozproszenia bocznego względem intensywności fluorescencji w PerCP-Cy™ 5.5. Ustaw bramkę leukocytów CD45+, jak pokazano na rysunku 8.

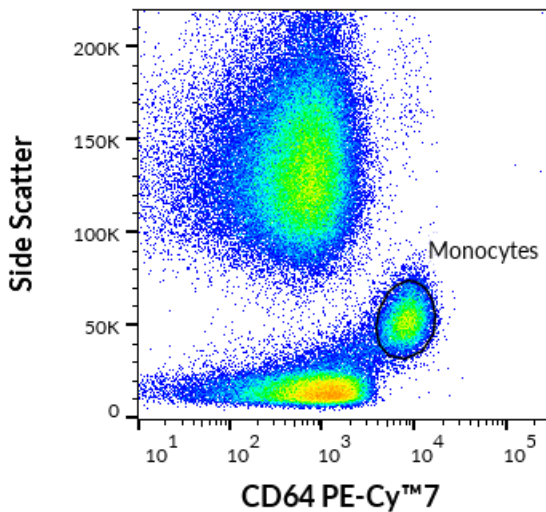
Rysunek 8 Wyznaczanie leukocytów CD45+ (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Monocyty

Wizualizuj leukocyty CD45+ na rozproszonym-wykresie bocznym-względem CD64 PE-Cy™7 i rozgranicz monocyty CD64+, jak pokazano na rysunku 9.

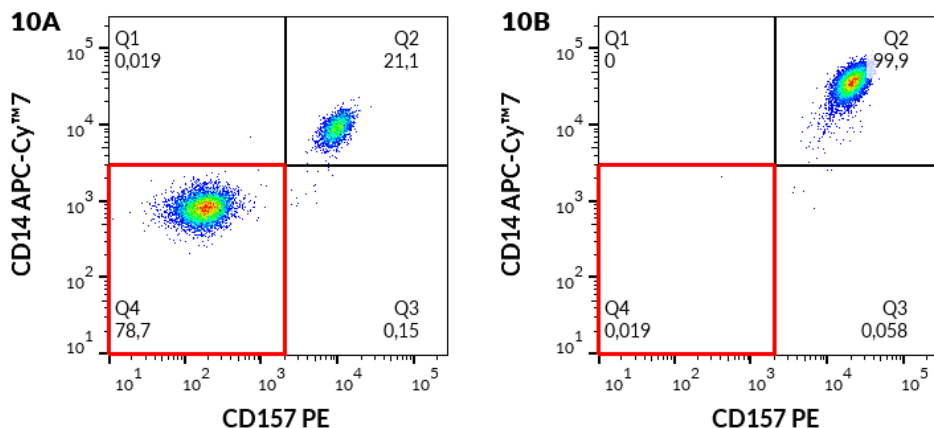
Rysunek 9 Wyodrębnienie monocytów CD64+ z leukocytów (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Wizualizuj monocyty CD64+ na wykresie punktowym CD157 PE względem CD14 APC-Cy™7 (rysunek 10). Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji CD157-CD14- w kwadrancie Q4.

Rysunek 10 Monocyty CD64+ na wykresie punktowym CD157 PE vs. CD14 APC- Cy™7 (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).

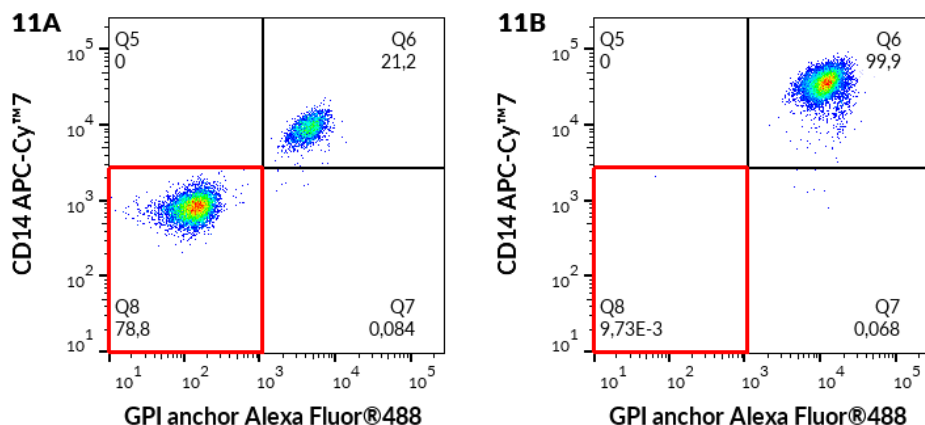
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same monocyty CD64+ na wykresie - punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) w porównaniu z CD14 APC-Cy™7 (rysunek 11). Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji kotwicy GPI-CD14- w kwadrancie Q4.

Rysunek 11 Monocyty CD64+ na wykresie punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) vs. CD14 APC Cy™7 (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).

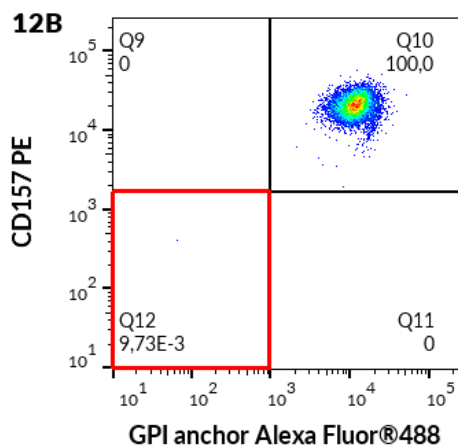
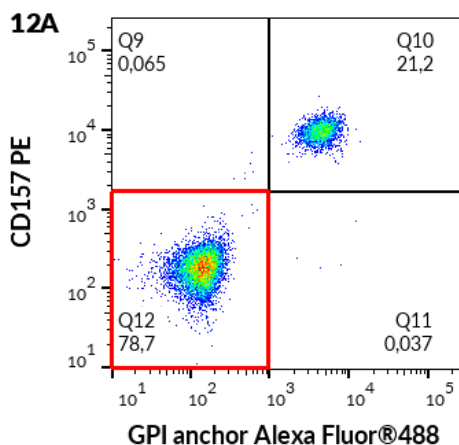
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same monocyty CD64+ na wykresie-punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) w porównaniu z CD157 PE (rysunek 12). Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji kotwicy GPI- CD157- w kwadrancie Q4.

Rysunek 12 Monocyty CD64+ na wykresie punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) vs. CD157 PE (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).

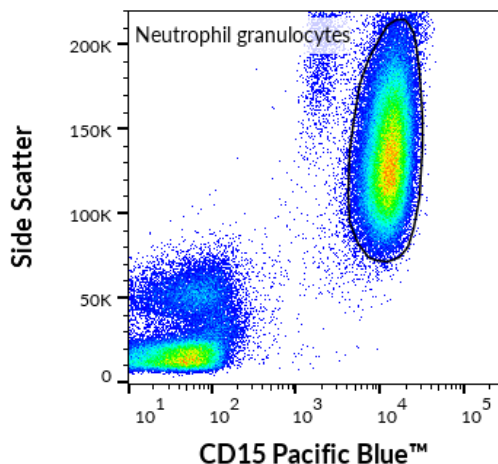
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Granulocyty obojętnochłonne

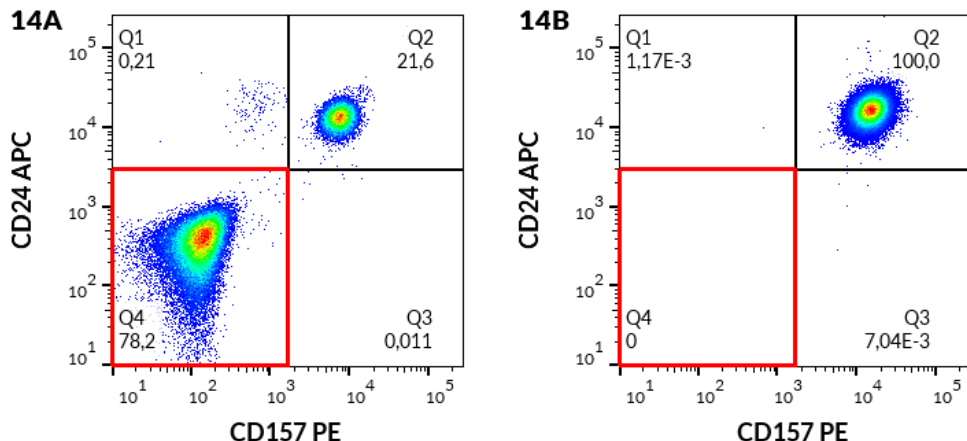
Wizualizuj leukocyty CD45+ na rozproszonym wykresie-punktowym bocznym-w porównaniu z CD15 Pacific Blue™ i oddzielnymi granulocytami obojętnochłonnymi CD15+, jak pokazano na rysunku 13.

Rysunek 13 Wyróżnienie granulocytów obojętnochłonnych CD15+ z leukocytów (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Zwizualizuj granulocyty obojętnochłonne CD15+ na wykresie-punktowym CD157 PE w porównaniu z CD24 APC, jak pokazano na rysunku 14. Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji CD157- CD24- w kwadrancie Q4.

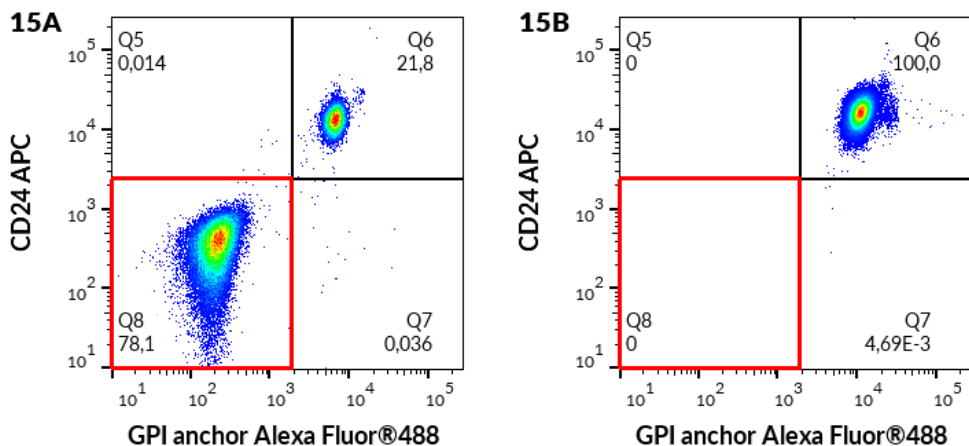
Rysunek 14 Granulocyty obojętnochłonne CD15+ na wykresie-punktowym CD157 PE vs. CD24 APC (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same granulocyty obojętnochłonne CD15+ na wykresie-punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) względem CD24 APC, ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji kotwicy GPI-CD24- w kwadrancie Q4, jak pokazano na rysunku 15.

Rysunek 15 Granulocyty obojętnochłonne CD15+ na wykresie-punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) w porównaniu z CD24 APC (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).

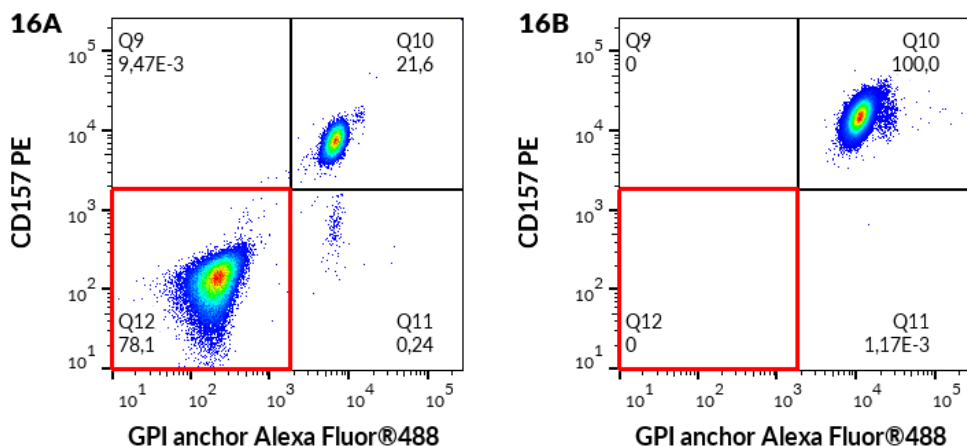
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same granulocyty obojętnochłonne CD15+ na wykresie- punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) względem CD157 PE, ustaw odpowiednie bramki i oblicz odsetek populacji kotwicy GPI-CD157- w kwadrancie Q4, jak pokazano na rysunku 16.

Rysunek 16 Granulocyty obojętnochłonne CD15+ w na wykresie-punktowym Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (kotwica GPI) w porównaniu z CD157 PE (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).

A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Obliczanie i interpretacja wyników analiz

Wylicz odsetek komórek z niedoborem GPI (mających fenotyp PNH), patrz tabela 5.

Tabela 5 Fenotypy klonów PNH

Populacja komórek macierzystych		Fenotyp PNH zgodnie ze strategią bramkowania
Probówka PNH RBC 3-color	Erytrocyty (Typ III)	CD59- CD235a+ (rys. 5)
	Erytrocyty (Typ II)	CD59 przyciemniony CD235a+ (rys. 5)
	iRBCs (Typ III)	CD59- CD235a+CD71+ (rys. 7)
	iRBCs (typ II)	CD59 przyciemniony CD235a+CD71+ (rys. 7)
Probówka PNH WBC 7-color	Monocyty	CD14- CD157- CD64+ (rys. 10)
		CD14- kotwica GPI - CD64+ (rys. 11)
		CD157- kotwica GPI - CD64+ (rys. 12)
	Granulocyty obojętnochłonne	CD24- CD157- CD15+ (rys. 14)
		CD24- kotwica GPI - CD15+ (rys. 15)
		CD157- kotwica GPI - CD15+ (rys. 16)

Tabela 6 Interpretacja wyników

Granica wykrywalności (odcięcie) dla próbek WBC i RBC podana jako częstość rodzicielska (%), obliczona na podstawie 100 pomiarów n=25 próbek zdrowych pacjentów na n=4 różnych platformach cytometrycznych				
Fenotyp PNH	Cytometr			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
Probówka PNH RBC 3-color				
CD59- Typ II i Typ III RBC	0,005	0,002	0,029	0,049
CD59- iRBCs typu II i typu III	0,240	0,320	0,388	0,562
Probówka PNH WBC 7-color				
CD157- CD14- Monocyty	0,20	0,19	0,14	0,30
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	0,08	0,04	0,10	0,17
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	0,07	0,06	0,04	0,03
CD157- CD24- Granulocyty obojętnochłonne	0,02	0,02	0,06	0,03
Kotwica GPI- CD24- Granulocyty obojętnochłonne	0,03	0,03	0,02	0,02
Kotwica GPI- CD157- Granulocyty obojętnochłonne	0,01	0,01	0,01	0,01

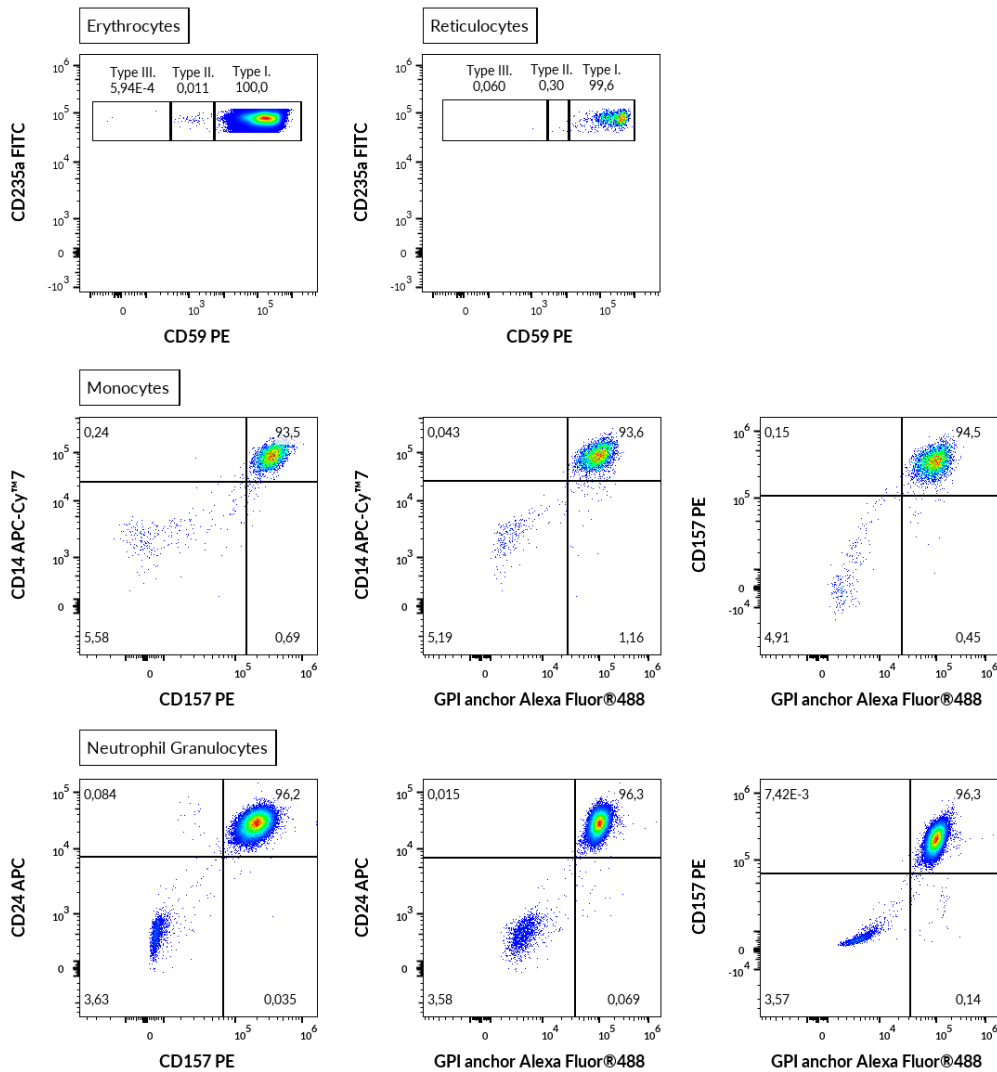
Reguły algorytmu raportowania braków GPI

1. U pacjentów z częstością występowania populacji komórek z niedoborem GPI **niższą** niż wartość odcięcia (tabela 6), wyniki należy podawać w następujący sposób: **„granulocyty, monocyty, krwinki czerwone i iRBCs wykazują normalną ekspresję antygenów związanych z GPI. Nie wykryto klonów PNH”** ⁽¹⁾.
2. U pacjentów z częstością populacji komórek z niedoborem GPI **wyższą** niż wartość odcięcia (tabela 6), wyniki należy podawać w następujący sposób: **„granulocyty, monocyty, krwinki czerwone lub iRBCs wykazują częściowy lub całkowity niedobór GPI”. Wykryto klony PNH.**

UWAGA: laboratorium kliniczne musi ustalić własne granice wykrywalności (LOD)/wartości odcięcia na podstawie zestawu próbek zdrowych pacjentów w przypadku korzystania z cytometru innego typu i/lub marki niż podano w tabelach 8-11 (patrz rozdział 11. Wydajność analityczna/granica wykrywalności/odcięcie testu).

3. W większości przypadków PNH wszystkie populacje komórek docelowych WBC wykazują obecność klonu PNH ^(4, 6, 7, 8). Klony WBC PNH wydają się zgrupowane i mniej rozproszone niż losowe zdarzenia podwójnie ujemne.
4. W niektórych przypadkach obecność klonu PNH może być wykryta w próbówce WBC, podczas gdy nie jest wykrywana w próbówce RBC, jak pokazano na **rys. 17**. W takim przypadku obecność klonu PNH musi zostać zgłoszona zgodnie z **zasadą 2 algorytmu raportowania braków GPI**.
5. W przypadku wykrycia jakiegokolwiek klonu PNH należy zawsze podać procent wszystkich fenotypów klonów PNH (tabela 6) z ich populacji komórek macierzystych. Monocyty mogą wykazywać większy rozmiar klonu PNH niż granulocyty obojętnochłonne ⁽²⁾.
6. Niedobór GPI (obecność klonu PNH) powinien być wyrażony we wszystkich fenotypach PNH w obrębie danego podzbioru leukocytów. Oczekuje się, że wszystkie fenotypy monocytów z PNH (tabela 5) będą barwić komórki z niedoborem GPI w podobny sposób ⁽⁶⁾. To samo dotyczy fenotypów neutrofilowych PNH.

Rysunek 17 Przykład przypadku z obecnością klonu PNH w próbce WBC, podczas gdy nie został on wykryty w próbce RBC (dane zebrane na urządzeniu Beckman Coulter DxFLEx).



11. Wydajność analityczna

Specyficzność

Proaerolysin Alexa Fluor® 488 to znakowana fluorescencyjnie odmiana aerolizyny bakteryjnej, która specyficznie wiąże się z kotwicami GPI powierzchniowych białek błonowych w komórkach ludzkich ^(1, 2, 5, 8).

Przeciwciało SY11B5 rozpoznaje zewnątrzkomórkowy epitop na antygenie CD157 antygeny CD157 wyrażanego głównie na monocytach i granulocytach. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA X).

Przeciwciało 2D1 rozpoznaje wszystkie izoformy leukocytów ludzkich CD45 (wspólny antygen leukocytów). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA III).

Przeciwciało 10.1 rozpoznaje ludzki antygen CD64, który ulega ekspresji na monocytach. Specyficzność przeciwciała została potwierdzona przez warsztaty HLDA (warsztaty HLDA III: WS Code M-250).

Przeciwciało SN3 reaguje z antygenem CD24, eksprymowanym przez granulocyty. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztat HLDA (HLDA IV: WS Code B 136; HLDA V: WS Code B CD24.7)

Przeciwciało MEM-15 reaguje z CD14, glikoproteiną błony zewnątrzkomórkowej połączoną z GPI (glikozylofosfatydilinozytolem), ulegającą ekspresji na monocytach. Specyficzność przeciwciała została potwierdzona przez radę HCDM (warsztaty HLDA III: WS Code M 252; HLDA IV: WS Code M 113; HLDA IV: WS Code NL 90; HLDA IV: WS Code T 53; HLDA V: WS Code M MA086; HLDA VI: WS Code M MA94).

Przeciwciało MEM-158 reaguje z CD15, silnie eksprymowanym na powierzchni granulocytów. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez radę HCDM (warsztaty HLDA VI: WS Code AS A053).

Przeciwciało JC159 rozpoznaje epitop zewnątrzkomórkowej części CD235a (glikoforyna A), sialoglikoproteinę eksprymowaną na wczesnych erytroblastach, późnych erytroblastach, erytroblastach i dojrzałych erytrocytach.

Przeciwciało MEM-43 reaguje z dobrze zdefiniowanym epitopem na glikoproteinie zakotwiczonej w CD59 (Protectin), (GPI), eksprymowanej na powierzchni wszystkich komórek krwiotwórczych. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztat HLDA (warsztaty HLDA IV: WS Code NL 705; HLDA V: WS Code AS S013; HLDA V: WS Code BP BP345; HLDA V: WS Code T T-103).

Przeciwciało MEM-75 reaguje z zewnątrzkomórkowym epitopem antygeny CD71 eksprymowanego na niedojrzałych iRBCs. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztat HLDA (warsztaty HLDA IV: WS Code A 45; HLDA V: WS Code T T-165).

Dokładność

Dokładność metody określono, porównując urządzenie DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego poprzez równoległe barwienie 13 pacjentów z potwierdzoną obecnością fenotypu PNH. Parametry analizy regresji liniowej przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7 Analiza regresji liniowej dla względnej liczby populacji komórek z niedoborem GPI (fenotypy PNH) u pacjentów z potwierdzoną obecnością fenotypów PNH (porównanie zestawu DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay z akredytowaną metodą wewnętrzną laboratorium klinicznego (koktajl skoniugowanych jednokolorowych przeciwciał różnych producentów i analizowany przy użyciu BD FACSCanto™ II))

Podzbiór limfocytów	n	Nachylenie	Przechwyty	R ²	Zakres [%]
CD59-CD235a+ erytrocyty typu III	13	0,99	-0,026	1,00	1,28 – 83,79
CD59-CD235a+ iRBCs typu III	13	0,99	-0,384	1,00	5,97 – 97,78
CD59-CD235a+ erytrocyty typu II	13	1,00	-0,059	1,00	0,13 – 89,92
CD59-CD235a+ iRBCs typu II	13	0,98	0,141	1,00	0,33 – 74,67
CD157- kotwica GPI-monocyty CD64+	13	1,00	0,060	1,00	2,07 – 99,95
CD157- kotwica GPI-granulocyty obojętnochłonne CD15+	13	0,99	0,294	1,00	0,80 – 99,82
Kotwica CD14- GPI-monocyty CD64+	13	Nieokreślono			2,04 – 99,96
Monocyty CD14- CD157-CD64+	13	Nieokreślono			2,17 – 99,96
CD24- CD157- CD15+ granulocyty obojętnochłonne	13	Nieokreślono			0,80 – 99,83
CD24- kotwica GPI-granulocyty obojętnochłonne CD15+	13	Nieokreślono			0,81 – 99,80

n = liczba próbek krwi

Granica wykrywalności / Granica oznaczalności / Assay Cut-off

Granice wykrywalności (LOD) określono dla każdej populacji docelowej (patrz tabela 5) jako średnią wartość wyników uzyskanych od 25 zdrowych dawców krwi, powiększoną o trzy odchylenia standardowe od średniej dla 4 różnych platform cytometru przepływowego i wyrażoną jako punkt odcięcia testu w tabeli 8, 9, 10 i 11.

UWAGA: laboratorium kliniczne musi ustalić własne limity wykrywalności (LOD)/wartości odcięcia na podstawie zestawu próbek zdrowych pacjentów, gdy używa cytometru innego typu i/lub marki niż podano w tabelach 8–11.

Tabela 8 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Wartości odcięcia dla każdego fenotypu PNH wraz z częstością występowania fenotypu PNH i LOQ uzyskane za pomocą cytometru przepływowego BD FACSLytic™.

Fenotyp PNH	BD FACSLytic™					
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	Odcięcie (Średnia + 3*SD)	LOQ (Średnia + 10*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% pojedynczych zdarzeń RBC)						
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,003	0,001	5 – 48 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń (średnio 25 zdarzeń)	0,005 %	0,012 %
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,054	0,061	0–5 zdarzeń na 3000 iRBCs (średnio 2 zdarzenia)	0,240 %	0,660 %
Probówka WBC (pobrano 200 000 zdarzeń)						
CD157- CD14- Monocyty	25	0,076	0,041	2–24 zdarzenia na 10 000 monocytów (średnio 8 zdarzeń)	0,20 %	0,49 %
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	25	0,021	0,018	0–5 zdarzeń na 10 000 monocytów (średnio 2 zdarzenia)	0,08 %	0,20 %
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	25	0,014	0,020	0–4 zdarzenia na 10 000 monocytów (średnio 1 zdarzenie)	0,07 %	0,21 %
CD157- CD24- Granulocyty obojętne	25	0,006	0,006	0–20 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnych (średnio 5 zdarzeń)	0,02%	0,07 %

Kotwica GPI- CD24-Granulocyty obojętnochłonne	25	0,006	0,008	0–29 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 6 zdarzeń)	0,03 %	0,09 %
Kotwica GPI- CD157-Granulocyty obojętnochłonne	25	0,002	0,002	0–8 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 2 zdarzenia)	0,01 %	0,02%

Tabela 9 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Wartości odcięcia dla każdego fenotypu PNH wraz z częstością występowania fenotypu PNH i LOQ uzyskane za pomocą cytometru przepływowego BD FACSCanto™ II.

Fenotyp PNH	BD FACSCanto™ II					
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	Odcięcie (Średnia + 3*SD)	LOQ (Średnia + 10*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% pojedynczych zdarzeń RBC)						
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,0006	0,0004	1 – 12 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń (średnio 6 zdarzeń)	0,002 %	0,004 %
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,0657	0,0847	0 – 5 zdarzeń na 1000 iRBCs (średnio 1 zdarzenie)	0,320%	0,913%
Probówka WBC (pobrano 200 000 zdarzeń)						
CD157- CD14-Monocyty	25	0,085	0,035	2–16 zdarzeń na 10 000 monocytów (średnio 8 zdarzeń)	0,19%	0,43%
Kotwica GPI- CD14-Monocyty	25	0,086	0,096	0–3 zdarzenia na 10 000 monocytów (średnio 1 zdarzenie)	0,04%	0,10%
Kotwica GPI- CD157-Monocyty	25	0,084	0,019	0–7 zdarzeń na 10 000 monocytów (średnio 1 zdarzenie)	0,06 %	0,20 %
CD157- CD24-Granulocyty obojętnochłonne	25	0,004	0,052	0–17 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 5 zdarzeń)	0,02%	0,06 %
Kotwica GPI- CD24-Granulocyty	25	0,006	0,010	0–32 zdarzenia na 100 000 granulocytów	0,03 %	0,10%

obojętnochłonne				obojętnochłonnych (średnio 6 zdarzeń)		
Kotwica GPI- CD157- Granulocyty obojętnochłonne	25	0,002	0,002	0-8 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 2 zdarzenia)	0,01 %	0,02%

Tabela 10 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Wartości odcięcia dla każdego fenotypu PNH wraz z występowaniem fenotypu PNH i LOQ uzyskane za pomocą cytometru przepływowego Beckman Coulter Navios EX.

Fenotyp PNH	Beckman Coulter NAVIOS EX					
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	Odcięcie (Średnia + 3*SD)	LOQ (Średnia + 10*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% pojedynczych zdarzeń RBC)						
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,007	0,007	4-236 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń (średnio 60 zdarzeń)	0,029%	0,081%
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,087	0,100	0-6 zdarzeń na 1000 iRBCs (średnio 1 zdarzenie)	0,388%	1,092%
Probówka WBC (pobrano 200 000 zdarzeń)						
CD157- CD14- Monocyty	25	0,062	0,027	0-23 zdarzenia na 10 000 monocytów (średnio 6 zdarzeń)	0,14%	0,33%
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	25	0,024	0,006	0-10 zdarzeń na 10 000 monocytów (średnio 2 zdarzenia)	0,10%	0,28 %
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	25	0,007	0,011	0-6 zdarzeń na 10 000 monocytów (średnio 1 zdarzenie)	0,04%	0,12%
CD157- CD24- Granulocyty obojętnochłonne	25	0,012	0,015	0-43 zdarzenia na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 12 zdarzeń)	0,06 %	0,16 %
Kotwica GPI- CD24- Granulocyty obojętnochłonne	25	0,005	0,005	0-13 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych	0,02%	0,05%

				(średnio 5 zdarzeń)		
Kotwica GPI- CD157- Granulocyty obojętnochłonne	25	0,002	0,002	0–10 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 2 zdarzenia)	0,01 %	0,03 %

Tabela 11 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Wartości odcięcia dla każdego fenotypu PNH wraz z występowaniem fenotypu PNH i LOQ uzyskane na cytometrze przepływowym Beckman Coulter DxFLEx.

Fenotyp PNH	Beckman Coulter DxFLEx					
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	Odcięcie (Średnia + 3*SD)	LOQ (Średnia + 10*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% pojedynczych zdarzeń RBC)						
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,015	0,012	5 – 48 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń (średnio 25 zdarzeń)	0,049%	0,129%
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,106	0,152	0 – 5 zdarzeń na 1000 iRBCs (średnio 2 zdarzenia)	0,562%	1,626%
Probówka WBC (pobrano 200 000 zdarzeń)						
CD157- CD14- Monocyty	25	0,092	0,068	0–27 zdarzeń na 10 000 monocyto- w (średnio 10 zdarzeń)	0,30%	0,77%
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	25	0,053	0,040	0–16 zdarzeń na 10 000 monocyto- w (średnio 6 zdarzeń)	0,17%	0,46%
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	25	0,005	0,009	0–1 zdarzeń na 10 000 monocyto- w (średnio 1 zdarzenie)	0,03 %	0,10%
CD157- CD24- Granulocyty obojętnochłonne	25	0,010	0,008	0–28 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 10 zdarzeń)	0,03 %	0,09 %
Kotwica GPI- CD24- Granulocyty obojętnochłonne	25	0,008	0,006	0–20 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętnochłonnych (średnio 8 zdarzeń)	0,02%	0,06 %

Kotwica GPI- CD157- Granulocyty obojętne	25	0,002	0,002	0-5 zdarzeń na 100 000 granulocytów obojętne (średnio 2 zdarzenia)	0,01 %	0,02%
--	----	-------	-------	---	--------	-------

UWAGA: Do analizy metodą cytometrii przepływowej wykorzystano następujące cytometry przepływowe wraz z wersją oprogramowania:
 BD FACSCanto™ II BD FACSDiva Software – wersja 8.0.2
 BD FACSLytic™ BD FACSuite™ Software – wersja v1.5.0.925
 Beckman Coulter DxFLEx CytExpert for DxFLEx – wersja 2.0.2.18
 Beckman Coulter Navios EX Navios EX Software – wersja 2.2

Do oceny zmierzonych danych wykorzystano platformę analityczną:
 FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - wersja 10.9.0

12. Wydajność kliniczna

Pacjenci z niedoborem GPI

Dane kliniczne zebrano w ośrodku klinicznym od 19 pacjentów, zarówno zdrowych ⁽⁶⁾, jak i z potwierdzonym niedoborem GPI ⁽¹³⁾. Określono skuteczność kliniczną jako porównanie urządzenia DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit z metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego (koktajl skoniugowanych jednokolorowych przeciwciał pochodzących od różnych producentów i analizowanych przy użyciu BD FACSCanto™ II).

Niedobór GPI u pacjentów oceniano w odniesieniu do zastosowanej metody (tabela 12) poprzez wykrywanie komórek z niedoborem GPI (klony PNH).

Tabela 12 Wydajność kliniczna urządzenia DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Ocena niedoborów GPI metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego	
		Niedobór GPI	Normalny stan
Ocena niedoborów GPI za pomocą urządzenia DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Niedobór GPI	13 pacjentów	0 pacjentów
	Normalny stan	0 pacjentów	6 pacjentów

13.Oczekiwane wartości

Interwał odniesienia

W populacji normalnej nie wykryto niedoboru GPI, a wszystkie wartości procentowe fenotypu PNH powinny być niższe od wartości Assay Cut-off (LOD) ⁽⁶⁾.

14.Ograniczenia

Nie zidentyfikowano ograniczeń stosowania w określonych typach chorób, takich jak niedokrwistość.

Zgłaszanie braków GPI jest ograniczone zgodnie z aktualnymi opublikowanymi wytycznymi ⁽⁶⁾.

15.Bibliografia

1) Borowitz, MJ et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2010 Jul;78(4):211-30. doi: 10.1002/cyto.b.20525.

2) Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. Cytometry Part B 2012; 82B: 195–208.

- 3) Marinov I, Illingworth AJ, Benko M, Sutherland DR. Performance Characteristics of a Non-Fluorescent Aerolysin-Based Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) Assay for Simultaneous Evaluation of PNH Neutrophils and PNH Monocytes by Flow Cytometry, Following Published PNH Guidelines. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Mar;94(2):257-263. doi: 10.1002/cyto.b.21389. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27294344.
- 4) Dezern, AE and Borowitz, MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 – clinical utility. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 16– 22.
- 5) Sutherland, DR, Illingworth, A, Marinov, I, Ortiz, F, Andreasen, J, Payne, D, Wallace, PK and Keeney, M. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 – reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 23–48.
- 6) Illingworth, A, Marinov, I, Sutherland, DR, Wagner-Ballon, O and DelVecchio, L. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 49– 66.
- 7) Sutherland DR, Richards SJ, Ortiz F, Nayyar R, Benko M, Marinov I, Illingworth A. CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal immature RBCs in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Mar;98(2):179-192. doi: 10.1002/cyto.b.21853. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31705743.
- 8) Sutherland DR, Ortiz F, Quest G, Illingworth A, Benko M, Nayyar R, Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jul;94(4):637-651. doi: 10.1002/cyto.b.21626. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29381839.
- 9) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
- 10) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
- 11) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: *Clin Chem* 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
- 12) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.

- 13) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x
- 14) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.
- 15) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem.* 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
- 16) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
- 17) Hervé Lecoeur, Marie-Lise Gougeon, Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes, *Journal of Immunological Methods*, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 18) Bartels EM, Falbe Wätjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis.* 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
- 19) XUE Yan, XU Li, DANG Liheng, WANG Chao, CUI Yaqiong, WANG Ping, WANG Ning, ZHANG Xinjie, LIU Yang. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2022, 37(12): 1169-1173
- 20) van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, et al. (2012) Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE* 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>
- 21) Yasmine Van Caeneghem, Stijn De Munter, Paola Tieppo, Glenn Goetgeluk, Karin Weening, Greet Verstichel, Sarah Bonte, Tom Taghon, Georges Leclercq, Tessa Kerre, Reno Debets, David Vermijlen, Hinrich Abken & Bart

- Vandekerckhove (2017) Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities, *Oncolmunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460
- 22) Lamia Achour, Mark G. H. Scott, Hamasseh Shirvani, Alain Thuret, Georges Bismuth, Catherine Labbé-Jullié, Stefano Marullo; CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009; 113 (9): 1938–1947. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141275>
 - 23) A. Stronkhorst, G. N. J. Tytgat & S. J. H. Van Deventer (1992) CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27:sup194, 61-65, DOI: 10.3109/00365529209096029
 - 24) Zinzani, P.L., Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 177–190 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>
 - 25) Whiteman KR, Johnson HA, Mayo MF, Audette CA, Carrigan CN, LaBelle A, Zukerberg L, Lambert JM, Lutz RJ. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small cell lung cancer in human xenograft models. *MAbs*. 2014 Mar-Apr;6(2):556-66. doi: 10.4161/mabs.27756. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24492307; PMCID: PMC3984343.
 - 26) J Frengen, B Kierulf, R Schmid, T Lindmo, K Nustad, Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, *Clinical Chemistry*, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>
 - 27) Urbina, A. and Palomino, F. (2013), Reticulocyte count in red-blood-cell units stored in AS-1. *Vox Sang*, 104: 331-336. <https://doi.org/10.1111/vox.12011>
 - 28) Ware RE, Rosse WF, Hall SE; Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 86 (4): 1586–1589. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V86.4.1586.bloodjournal8641586>

16.Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania

Podsumowanie bezpieczeństwa i działania będzie dostępne w bazie danych Eudamed pod adresem <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Do tego czasu podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania jest dostępne na żądanie.

17. Używanie znaków towarowych stron trzecich

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™ i FlowJo™ są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company. Cy™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Cytiva. VenturiOne® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Cytognos S.L.. SPHERO™ COMPTrol jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Spherotech, Inc..

18. Historia zmian

Wersja 2, ED7750_IFU_v2

- 1) Dodano interferencję endogeniczną i egzogeniczną.
- 2) Zaktualizowano sekcję „Zasady algorytmu raportowania braków w GPI”.
- 3) Sekcja 13. Wartości oczekiwane – drobne poprawki tekstu.
- 4) Zaktualizowano odniesienia.
- 5) Dodanie numeru identyfikacyjnego jednostki notyfikowanej.
- 6) Dodanie nowego numeru rozdziału 16. Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania.

19. Producent

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Republika Czeska

Dane kontaktowe

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

20. Upoważnieni przedstawiciele

N/A

UWAGA: każdy poważny incydent, który miał miejsce w związku z urządzeniem, należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi lokalnemu.