

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

25 testů | Kat. č. ED7750

IVD **CE** 2265

Návod k použití (CS)

Verze: ED7750_IFU_v2_CS

Datum vydání: 25-10-2024

Symbole použité k označení prostředku

IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Omezení teploty
CE 2265	Označení shody CE ID číslo notifikované osoby		Chránit před slunečním zářením
	Výrobce		Chránit před vlhkem
UDI	Jedinečná identifikace prostředku (UDI)		Pozor
	Čtěte návod k použití		Nepoužívat opakovaně
	Obsah postačuje pro <n> testů	TUBE	Obsahuje <n> zkumavek na jedno použití
REF	Katalogové číslo	CONC 10x	Koncentrovaný roztok (10x)
LOT	Kód dávky	CONTENTS	Obsah
	Použit do data	UK CA	Označení shody UKCA

1. Určený účel prostředku

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit detekuje a počítá buňky s glykosyl-fosfatidyl-inositolovým (GPI) deficitem z plné lidské krve pomocí průtokové cytometrie.

Co se zjišťuje a/nebo měří

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit detekuje a měří buňky s glykosyl-fosfatidyl-inositolovým (GPI) deficitem (PNH klony) jako procentuální zastoupení:

- CD59 dim nebo CD59- buněk ze všech erytrocytů (CD235a+)
- CD59 dim nebo CD59- buněk ze všech iRBC (CD235a+CD71+)
- CD14-, CD157- a GPI kotva- buněk ze všech monocytů (CD45+CD64+)
- CD24-, CD157- a GPI kotva- buněk ze všech neutrofilních granulocytů (CD45+CD15+)

Funkce prostředku

Prostředek je určen ke stanovení diagnózy a monitorování pacientů trpících, nebo s podezřením na paroxysmální noční hemoglobinurii (PNH) a související poruchy ⁽¹⁾.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) je vzácná porucha hematopoetických kmenových buněk, která je důsledkem nezhoubné klonální expanze buněk se somatickou mutací genu pro biosyntézu glykosylfosfatidylinositolu A (PIG-A). Mutace v genu PIG-A vede k neschopnosti exprimovat glykosyl-fosfatidyl-inositol (GPI)-kotvené povrchové proteiny.

Prostředek je určen k detekci GPI-deficitních neutrofilních granulocytů a monocytů ⁽¹⁾ spolu s kompletně (Typ III) a částečně (Typ II) GPI-deficitními erytrocyty ^(2,3,4,5,6) pro hodnocení velikosti PNH klonu.

Kromě toho prostředek detekuje GPI-deficitní iRBC (nezralé erytrocyty) u pacientů, kteří dostávají krevní transfuze, kdy je obtížné definovat PNH erytrocyty ⁽⁷⁾.

Typ testu

Není automatizovaný

Kvantitativní

Typ požadovaného vzorku

Vzorek lidské antikoagulované periferní plné krve (EDTA, heparin, citrát) ⁽¹⁾

Testovací populace

Pacienti s:

- laboratorními markery hemolýzy, pokud byly vyloučeny jiné častější příčiny hemolýzy,
- nevysvětlitelnými trombózami v mladém věku,
- diagnostikovanými trombózami na neobvyklém místě,
- dědičnou nebo získanou aplastickou anémií (AA),
- myelodysplastickým syndromem (MDS),
- nevysvětlitelnou cytopenií, u níž jsou AA nebo MDS diferenciaciálně diagnostickými úvahami ⁽¹⁾

2. Účel použití

Prostředek je určen pouze pro profesionální použití v laboratoři. Prostředek není určen pro vyšetření v blízkosti pacienta nebo přímo u pacienta a není určen pro sebetestování.

Požadavky na kvalifikaci

Uživatel musí mít současné odborné znalosti v oblasti průtokové cytometrie, ovládat standardní laboratorní techniky, včetně pipetování, manipulovat bezpečně a správně se vzorky z lidského těla.

Uživatel musí splňovat normu EN ISO 15189, případně jiné národní legislativní normy.

3. Princip testu

Princip testu je založen na detekci GPI kotvy a GPI-ukotvených proteinů na povrchu lidských krevních buněk. Monoklonální protilátky a rekombinantní proaerolysin použité v testu jsou značené různými fluorochromy, které jsou excitovány laserovým paprskem z průtokového cytometru během akvizice zpracovaného krevního vzorku. Fluorescence (emise světla) zachycená z každého fluorochromu na naznačené krevní buňce je následně sbírána a analyzována cytometrem. Intenzita fluorescence je přímo úměrná hustotě exprese antigenu v detekované buňce, což umožňuje rozlišení různých buněčných subpopulací.

4. Poskytované materiály

Obsah

Prostředek DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, který vystačí k vyšetření 25 pacientů, je dodáván ve formátu:

PNH High-Sensitivity Assay (25 sáčků). Každý sáček se skládá z jednobarevné (modrý proužek) uzavřené zkumavky na jedno použití **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) a jednobarevné (červený proužek) uzavřené zkumavky na jedno použití **PNH RBC 3-color** (ED7750-2), obsahující kombinaci sušených fluorescenčních

značených reagensií se stabilizačními složkami na dně testovacích zkumavek (12 x 75 mm), viz tabulka 1 a 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 láhev) obsahující 15 ml koncentrovaného (10X) roztoku na bázi formaldehydu.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 sáček) obsahující 10 uzavřených zkumavek na jedno použití, z nichž každá obsahuje sušenou fluorescenčně značenou reagensii se stabilizačními složkami na dně testovací zkumavky (12 x 75 mm).

UPOZORNĚNÍ: PNH Kompenzační set je určen pouze k nastavení kompenzace. Jednotlivé fluorescenčně značené reagensie (tabulka 1 a 2) umožňují snadný a přesný postup kompenzace.

Složení

Tabulka 1 Popis aktivních složek PNH WBC 7-color

Antigen	Fluorochrom	Klon	Izotyp
GPI kotva (Proaerolysin)	Alexa Fluor®488	N/A	N/A
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

Tabulka 2 Popis aktivních složek PNH RBC 3-color

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

5. Nutné, ale neposkytované materiály

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr (1X PBS), pH 7,2 – 7,4

Kompenzační částice pro průtokovou cytometrii (Spherotech SPHERO™ COMPTrol Kit, Kat. č. CMIgP-50-3K nebo podobné kompenzační částice)

6. Nutná zařízení

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (100 µl – 5 ml) pro pipetování vzorků a činidel

Dávkovač kapalin nebo pipeta s jednorázovými špičkami (2 ml) pro dávkování lyzačního roztoku

Vortex

Kónické polypropylenové centrifugační zkumavky (15 ml nebo 50 ml) pro přípravu vzorků

Centrifuga s příslušnými adaptéry rotoru na zkumavky s kulatým dnem 12 x 75 mm

Průtokový cytometr vybavený třemi laserovými excitačními zdroji (488 nm, ~635 nm a 405 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů z fluorochromů uvedených v tabulce 3

Tabulka 3 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v prostředí

Fluorochrom	Excitace [nm]	Emise [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

POZNÁMKA: Prostředek byl testován na průtokových cytometrech BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 20-30 °C.

Vyhněte se dlouhodobé expozici na světle.

Udržujte v suchu.

UPOZORNĚNÍ: Produkt citlivý na vlhkost. Fóliový sáček otevírejte bezprostředně před prvním použitím.

Informace o stabilitě po prvním otevření a době použitelnosti po prvním otevření, spolu s podmínkami skladování a stabilitou pracovních roztoků (v případě potřeby) naleznete v části 10 Postup (Příprava reagensů).

8. Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VAROVÁNÍ: Lysing solution (ED7750-3) obsahuje formaldehyd (CAS č. 50-00-0) a metanol (CAS č. 67-56-1) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Nebezpečí
	
H-věty	H315: Dráždí kůži. H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. H319: Způsobuje vážné podráždění očí. H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest. H341: Podezření na genetické poškození. H350: Může vyvolat rakovinu. H371: Může způsobit poškození orgánů. H373: Může způsobit poškození ledvin při prodloužené nebo opakované expozici při požití. H302+H312+H332: Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží nebo při vdechování.
P-věty	P201: Před použitím si obzarejte speciální instrukce. P260: Nevdechujte páry. P264: Po manipulaci důkladně omyjte ruce a zasažené části těla. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. P301+P312: PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P302+P352: PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. P305+P351+P338: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. P308+P313: PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P314: Necítíte-li se dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P333+P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P362+P364: Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Úplné informace o rizicích, která představují chemické látky a směsi obsažené v tomto výrobku a o tom, jak s nimi zacházet a jak je likvidovat, naleznete v Bezpečnostním listu (SDS), který je k dispozici na www.exbio.cz.

Biologické riziko

Lidské biologické vzorky, krevní vzorky a jakékoliv materiály, které s nimi přicházejí do kontaktu, jsou vždy považovány za infekční.

Používejte osobní ochranné a bezpečnostní pomůcky, abyste zabránili kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.

Dodržujte všechny platné zákony, předpisy a postupy pro manipulaci a likvidaci infekčních materiálů.

Projevy znehodnocení prostředku

Normální vzhled dodané reagentie je průhledná vysušená vrstva na dně zkumavky. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. přítomnost vlhkosti uvnitř zkumavky.

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

Nepoužívejte zkumavky opakovaně.

9. Vzorek

Použijte žilní periferní krev odebranou do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem EDTA, heparin nebo ACD (Acid Citrat Dextrose) ⁽²⁾.

Používejte pouze čerstvý a nepřepracovaný vzorek. Nepoužívejte předem lyzovaný, promytý nebo zředěný vzorek.

Vzorek krve zpracujte nejpozději do 48 hodin po odběru. Vzorek krve v odběrové zkumavce musí být skladován při laboratorní teplotě. Neuchovávejte v chladničce.

Endogenní interference

Na základě výzkumu vědecké literatury jsou zdroje endogenní interference identifikovány v tabulce 4.

Tabulka 4 Endogenní interference prostředku

Endogenní interference	Vliv	Odkazy
Albumin	Albumin může interferovat ve vysokých koncentracích díky své schopnosti vázat a také uvolňovat velká množství ligandů.	9, 10, 26
Bilirubin (žloutenka) (nekonjugovaný)	Bilirubin může zvýšit fluorescenční pozadí buněk díky své vysoké autofluorescenci.	13, 15, 19
Zbytky buněk (po lýze)	Zbytky buněk mohou poskytovat nepřesné počty buněk a vyčerpát	12, 16

	protilátky v zařízení.	
Erytrocyty	Nedostatečná lýza, červené krvinky přítomné ve vzorku mohou vést k chybnému počítání buněk.	17
Hemoglobin	Hemolyzované vzorky mohou poskytovat chybné výsledky.	14
Lidské anti-myší protilátky	Může ovlivnit funkčnost prostředku (schopnost vázat se na antigeny buněčného povrchu).	11, 21, 22, 23, 24, 25
Imunoglobuliny	Může ovlivnit počet podskupin lymfocytů.	12
Revmatoidní faktory	Přítomnost RF interferuje s MIA (multiplexní imunoanalýzy).	18
Triglyceridy	Vysoké cirkulující hladiny lipidů mohou ovlivnit analýzu průtokovou cytometrií určitých populací krevních buněk.	20

Exogenní interference

Podle publikovaných článků Sutherlanda et. al.⁽⁷⁾ jsou červené krvinky z krevních transfuzí hlavním rušivým faktorem při analýze PNH u pacientů s velkým klonem PNH, u nichž dochází k extravaskulární hemolýze. Zdravé erytrocyty přijaté transfuzí významně ovlivňují sledování PNH klonu v červené krevní řadě (RBC). Přidání CD71 významně zlepšuje schopnost analyzovat velikost PNH klonu v linii RBC bez ohledu na hemolytický a/nebo transfuzní stav pacienta.

Prostředek DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit překonává tento problém podle dříve uvedených doporučení tím, že nabízí antigen CD71 pro identifikaci nezralých červenýchrvinek (iRBC), kde iRBC rovněž exprimují antigen CD59 ukotvený v GPI. V transfuzních vacích jsou iRBC obvykle zastoupeny ve velmi malém množství ⁽²⁷⁾. Na druhou stranu pacienti, u nichž dochází k extravaskulární hemolýze způsobené PNH, mají zvýšený počet iRBC v důsledku rychlých ztrát erytrocytů ⁽²⁸⁾. Přidáním monoklonální protilátky CD71 k identifikaci iRBC má tedy lékař k dispozici přesnější sledování průběhu PNH, které je hlášeno jako ztráta antigenu CD59 na iRBC, a překonává tak interferenci exogenních RBC z transfuzních vaků. DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit obsahuje protilátku proti lidskému CD71 a umožňuje použití nejnovějších doporučení pro detekci a kvantifikaci klonu PNH.

10. Postup

Příprava reagensí

PNH High-Sensitivity Assay

Není nutná žádná příprava reagensie. Reagensie se dodává ve zkuševkách na jedno použití.

Lyzační roztok

Před použitím vytemperujte činidlo na pokojovou teplotu.

Naředte 10X koncentrovaný lyzační roztok na pracovní roztok deionizovanou vodou (1 objem koncentrovaného roztoku a 9 objemů deionizované vody). Po prvním otevření si činidlo zachovává své funkční charakteristiky až do data expirace, pokud je skladováno za uvedených podmínek v původní primární nádobě.

Naředěný lyzační roztok (1X) je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud je skladován v dávkovací kapalině nebo uzavřené nádobě při laboratorní teplotě.

Příprava nutných, ale neposkytovaných materiálů

Kompenzační částice

Podle pokynů výrobce připravte pracovní roztok kompenzačních částic na průtokový cytometr.

Nastavení kompenzace

Změřte zkuševky PNH Compensation Set pomocí stejného nastavení průtokového cytometru jako v případě obarvených zkuševek PNH RBC 3-color a PNH WBC 7-color.

UPOZORNĚNÍ: Postup nastavení kompenzace pomocí PNH RBC 3-color a PNH WBC 7-color se liší typem přípravy vzorku a barvením vzorku.

PNH RBC 3-color kompenzační zkuševky (červený proužek)

1. Přidejte SPHERO™ COMPTrol Kit nebo ekvivalentní kompenzační částice na dno každé jednobarevné kompenzační zkuševky.
2. Vortexujte a následně inkubujte po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
3. Přidejte 4 ml 1X PBS do každé kompenzační zkuševky. Centrifugujte 5 minut při 300×g.
4. Odstraňte supernatant bez narušení kompenzačních částic a přidejte 0,1 ml 1X PBS do každé kompenzační zkuševky.
5. Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno

dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.

6. Obarvené kompenzační zkušební skleničky ihned měřte průtokovým cytometrem.
7. Vypočítejte kompenzační matici PNH RBC 3-color buď v softwaru vyvinutém výrobcem cytometru nebo v softwaru určeném pro offline analýzu cytometrických dat. Tuto kompenzační matici použijte pro všechny zkušební skleničky této šarže PNH RBC 3-color

UPOZORNĚNÍ: Po nastavení pro konkrétní šarži PNH RBC 3-color neměňte nastavení fluorescenčních detektorů, abyste zachovali stejné nastavení kompenzační matice a výsledky kompenzace.

PNH WBC 7-color kompenzační zkušební skleničky (modrý proužek)

1. Přidejte 50 µl deionizované vody na dno každé jednobarevné kompenzační zkušební skleničky a intenzivně vortexujte po dobu 7 – 10 sekund.
2. Přidejte 100 µl periferní plné krve do každé jednobarevné kompenzační zkušební skleničky a intenzivně vortexujte.
3. Inkubujte po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
4. Přidejte 2 ml pracovního roztoku lyzačního činidla (1X) do každé kompenzační zkušební skleničky.
5. Inkubujte po dobu 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
6. Centrifugujte po dobu 5 minut při 300×g, odstraňte supernatant a resuspendujte buněčný pelet ve 2 ml 1X PBS.
7. Centrifugujte po dobu 5 minut při 300×g, odstraňte supernatant a resuspendujte buněčný pelet v 0,2 ml 1X PBS.
8. Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.
9. Obarvené kompenzační zkušební skleničky ihned měřte průtokovým cytometrem.
10. Vypočítejte kompenzační matici PNH WBC 7-color buď v softwaru vyvinutém výrobcem cytometru nebo v softwaru určeném pro offline analýzu cytometrických dat. Tuto kompenzační matici použijte pro všechny zkušební skleničky této šarže PNH WBC 7-color.

UPOZORNĚNÍ: Po nastavení pro konkrétní šarži PNH WBC 7-color neměňte nastavení fluorescenčních detektorů, abyste zachovali stejné nastavení kompenzační matice a výsledky kompenzace.

Příprava vzorku

Detekce a odlišení PNH klonů v erytrocytech pomocí PNH RBC 3-color zkumavek vyžaduje přípravu vzorku před barvením.

POZNÁMKA: Před zpracováním vzorku se ujistěte, že je cytometr správně nastaven.

1. Označte polypropylenovou kónickou zkumavku identifikačním údajem vzorku.
2. Pipetujte 10 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno označené kónické zkumavky.
3. Naředěte krevní vzorek v poměru 1:100 pomocí 1 ml 1X PBS a promíchejte po dobu 5 sekund ručním kýváním.

UPOZORNĚNÍ: V klasické formě PNH dominuje intravaskulární hemolýza. Před ředěním krevního vzorku se podívejte na počty červených krvinek z hematologického analyzátoru, abyste dosáhli počtu červených krvinek ve zředěném krevním vzorku v rozmezí $3 - 5 \times 10^7$ / ml naředěné krve a upravte faktor ředění podle potřeby, abyste získali dostatečný počet červených krvinek z průtokového cytometru.

4. Po naředění vzorku ihned přejděte k barvení vzorku.

Detekce buněk s GPI deficitem v neutrofilních granulocytech a monocytech pomocí PNH WBC 7-color zkumavek nevyžaduje žádnou přípravu vzorku před barvením.

Značení vzorku – PNH RBC 3-color zkumavka (červený proužek)

1. Označte PNH RBC 3-color zkumavku identifikačním údajem vzorku.
2. Pipetujte 50 µl dobře promíchaného naředěného krevního vzorku na dno PNH RBC 3-color zkumavky.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud stopy nebo kapky krve ulpí na stěně zkumavky, nemusí být obarveny reagensy a výsledky testu nemusí být platné.

3. Intenzivně vortexujte po dobu 7-10 sekund.

UPOZORNĚNÍ: Zkrácení doby vortexování může ovlivnit výsledky testu.

4. Inkubujte zkumavku PNH RBC 3-color po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.

5. Přidejte 4 ml 1X PBS do zkumavky PNH RBC 3-color.
6. Centrifugujte zkumavku PNH RBC 3-color 5 minut při 300×g.
7. Odstraňte supernatant bez narušení buněčné pelety a přidejte 0,5 ml 1X PBS do PNH RBC 3-color zkumavky.
8. Krátce vortexujte, aby se buněčná peleta resuspendovala.

Obarvený vzorek ihned měřte průtokovým cytometrem. V případě, že obarvený vzorek nebude okamžitě změřen, uzavřete zkumavku víčkem, uchovávejte v temnu při 2-8 °C a analyzujte do 2 hodin.

UPOZORNĚNÍ: Před měřením na průtokovém cytometru narušte buněčné agregáty v obarveném vzorku tak, že pevně uchopíte zkumavku a přejíždíte dnem zkumavky po vrchní straně stojanu na vzorky. Nadměrné množství RBC agregátů může ovlivnit výsledky testu.

Značení vzorku – PNH WBC 7-color zkumavka (modrý proužek)

1. Označte PNH WBC 7-color zkumavku identifikačním údajem vzorku.
2. Přidejte 50 µl deionizované vody do zkumavky PNH WBC 7-color. Intenzivně vortexujte po dobu 7-10 sekund.

UPOZORNĚNÍ: Zkrácení doby vortexování může ovlivnit výsledky testu.

3. Pipetujte 100 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno zkumavky PNH WBC 7-color a intenzivně vortexujte.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud stopy nebo kapky krve ulpí na stěně zkumavky, nemusí být obarveny reagencií a výsledky testu nemusí být platné.

4. Inkubujte po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
5. Přidejte 2 ml pracovního roztoku lyzačního činidla (1X) do PNH WBC 7-color zkumavky.
6. Inkubujte po dobu 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
7. Centrifugujte zkumavku PNH WBC 7-color 5 minut při 300×g.
8. Odstraňte supernatant bez narušení buněčné pelety a přidejte 2 ml 1X PBS do testovací zkumavky.
9. Centrifugujte zkumavku PNH WBC 7-color 5 minut při 300×g.
10. Odstraňte supernatant bez narušení buněčné pelety a přidejte 0,2 ml 1X PBS do testovací zkumavky.

11. Krátce vortexujte, aby se buněčná peleta resuspendovala.

Obarvený vzorek ihned měřte průtokovým cytometrem. V případě, že obarvený vzorek nebude okamžitě změřen, uzavřete zkumavku víčkem, uchovávejte v temnu při 2-8 °C a analyzujte do 24 hodin.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s prostředkem DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit musí být rutinně kalibrován pomocí fluorescenčních mikrokuliček podle pokynů výrobce cytometru, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

Při nesprávné údržbě může průtokový cytometr poskytovat falešné výsledky.

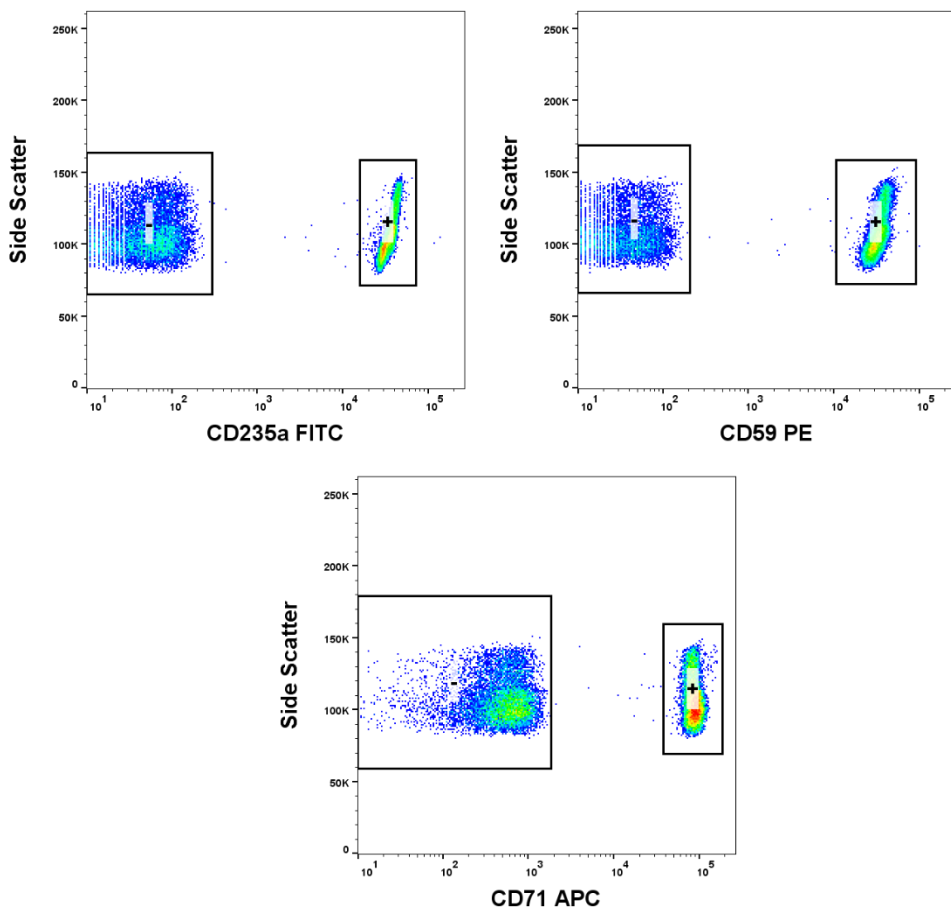
V sekci 6 Nutná zařízení jsou uvedeny potřebné specifikace cytometru pro lasery a fluorescenční detektory podle excitačních a emisních charakteristik fluorochromů.

Pro analýzu naměřených dat je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analýza PNH RBC 3-color kompenzačních zkumavek (červený proužek)

Zobrazte nekompenzovaná data pro každou kompenzační zkumavku v grafu side-scatter (SSC) versus „fluorochrom, který má být kompenzován“. Nastavte regiony (gaty) pro pozitivní (+) a negativní (-) kompenzační částice, jak je znázorněno na obrázku 1.

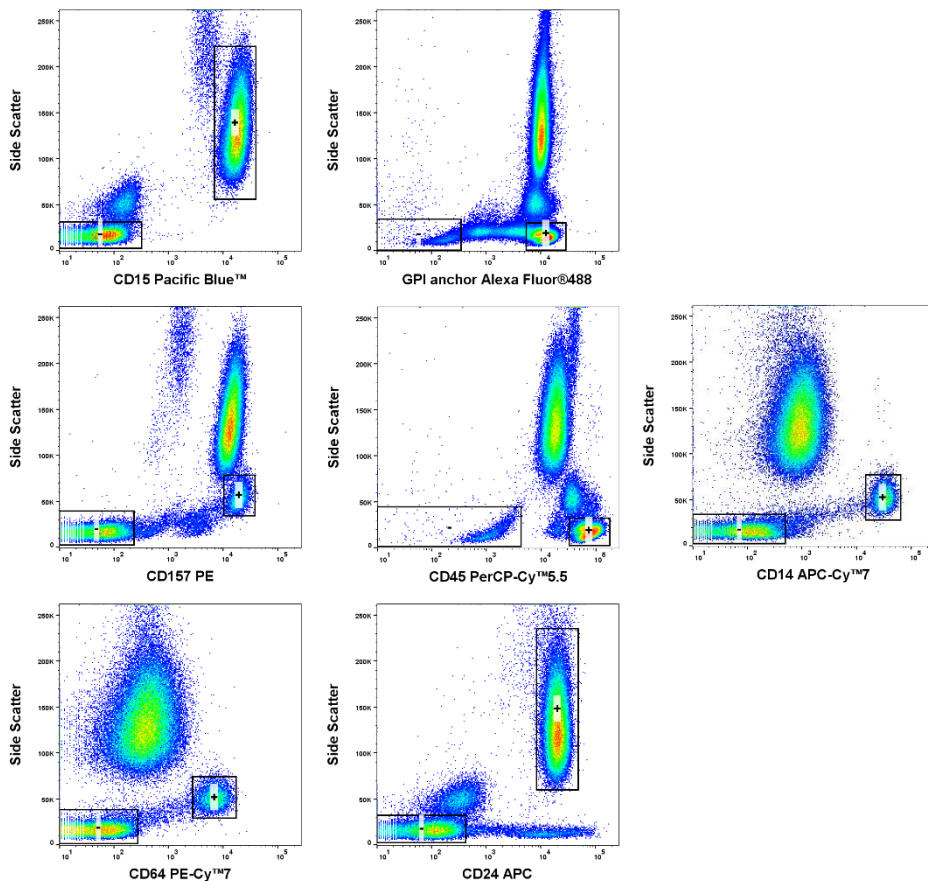
Obrázek 1 Identifikace pozitivních (+) a negativních (-) kompenzačních částic v kompenzačních zkumavkách (data získaná na BD FACSCanto™ II).



Analýza PNH WBC 7-color kompenzačních zkušavek (modrý proužek)

Zobrazte nekompenzovaná data pro každou kompenzační zkušavku v grafu sice-scatter (SSC) versus „fluorochrom, který má být kompenzován“. Nastavte regiony (gaty) pro nejvíce pozitivní (+) a nejvíce negativní (-) populace, jak je znázorněno na obrázku 2.

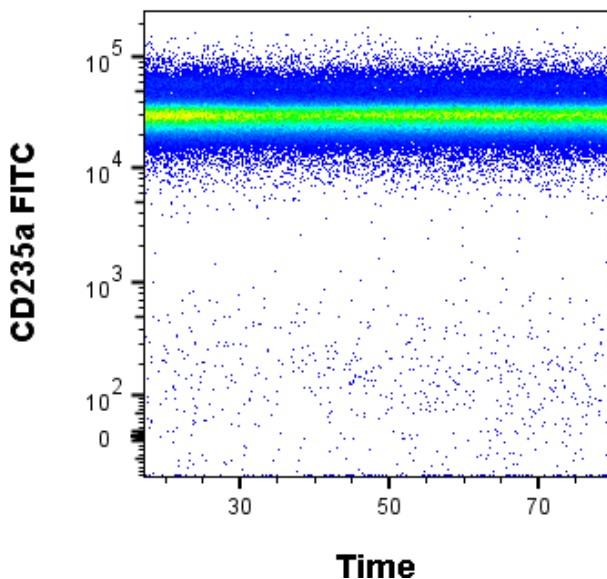
Obrázek 2 Identifikace nejvíce pozitivních (+) a nejvíce negativních (-) událostí v kompenzačních zkušavkách (data získaná na BD FACSCanto™ II).



PNH RBC 3-color zkumavka (červený proužek)

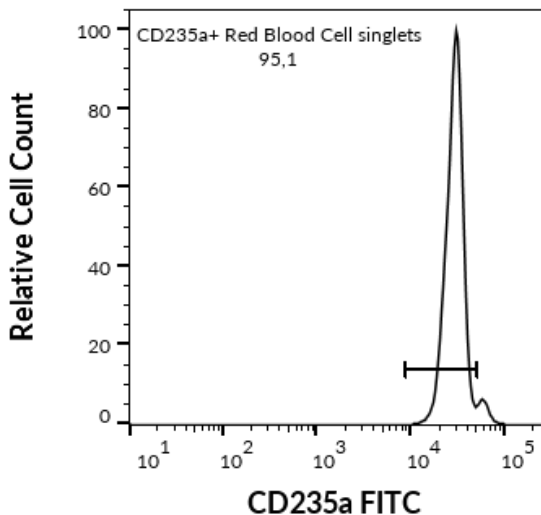
Vzhledem k nízkému iRBC ve zředěném krevním vzorku, zajistěte pro analýzu 500 000 – 1 500 000 událostí erytrocytů. Zaznamenání $\geq 500\,000$ událostí trvá delší dobu. Může to ovlivnit rovnováhu vazebného komplexu protilátka-antigen a snížení fluorescence CD235a FITC. Vždy sledujte stabilitu intenzity fluorescence po dobu akvizice (obrázek 3).

Obrázek 3 Všechny získané události v grafu dot-plot CD235a FITC vs. čas (data získaná na BD FACSCanto™ II).



Zobrazte kompenzovaná data jako histogram, kde osa X představuje intenzitu fluorescence v kanálu FITC. Nastavte vhodný region (gate) pro CD235a+ RBC singlety (obrázek 4).

Obrázek 4 Vymezení CD235a+ RBC singletů (data získaná na BD FACSCanto™ II).



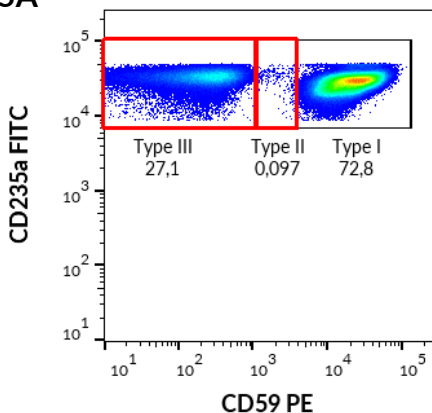
Erytrocyty

Zobrazte CD235a+ RBC singlety v grafu CD59 PE versus CD235a FITC. Rozdělte události do tří populací pomocí tří vhodných regionů (gatů) (obrázek 5) a vypočítejte procento událostí v oblastech typu I, typu II a typu III.

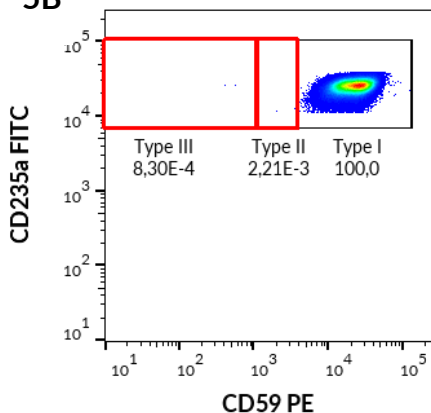
Obrázek 5 CD235a+ RBC singlety v grafu CD59 PE versus CD235a FITC (data získaná na BD FACSCanto™ II).

A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárcce

5A



5B

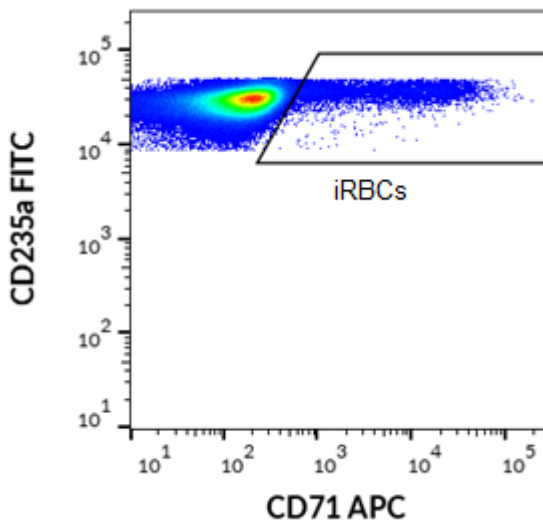


iRBCs (nezralé erytrocyty)

Zobrazte singlety CD235a⁺ RBC v grafu CD71 APC versus CD235a FITC a oddělte CD71⁺ iRBC (obrázek 6).

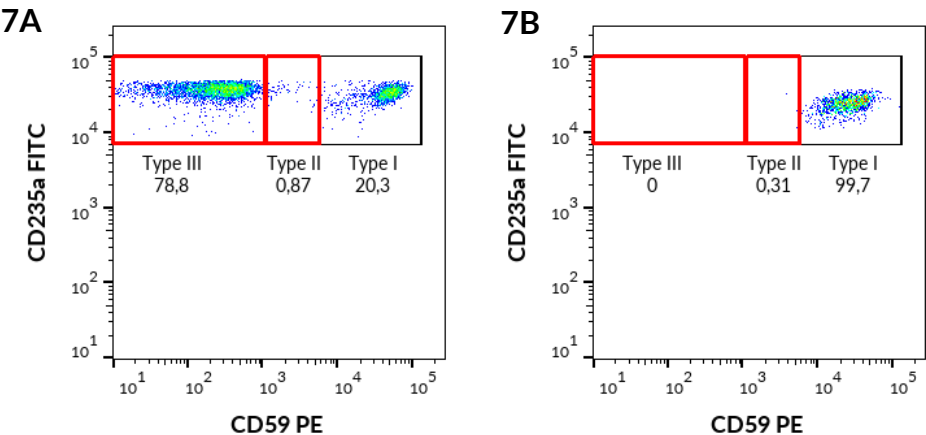
Obrázek 6 CD235a⁺ RBC singlety v grafu CD71 APC versus CD235a FITC.

Oddělení CD71⁺ iRBC (data získaná na BD FACSCanto™ II).



Zobrazte CD71+ iRBC v grafu CD59 PE versus CD235a FITC. Rozdělte události do tří populací pomocí tří vhodných regionů (gatů) (obrázek 7) a vypočítejte procento událostí v oblastech typu I, typu II a typu III.

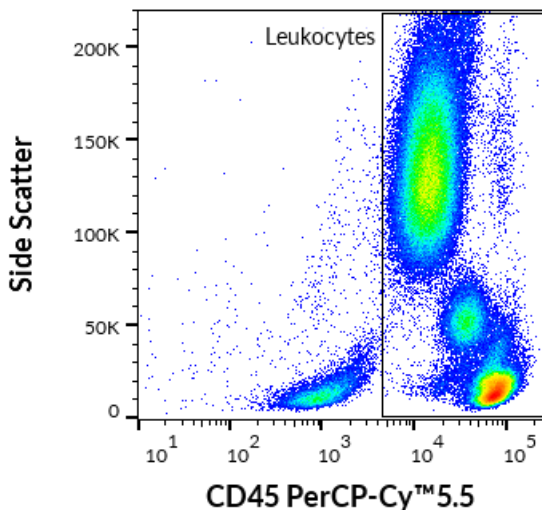
Obrázek 7 CD71+ iRBC v grafu CD59 PE versus CD235a FITC (data získaná na BD FACSCanto™ II).
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



PNH WBC 7-color zkumavka (modrý proužek)

Pro analýzu získejte alespoň 200 000 událostí. Zobrazte naměřená kompenzovaná data v grafu side-scatter (SSC) versus intenzita fluorescence v kanále PerCP-™5.5. Nastavte vhodný region (gate) pro CD45+ leukocyty, jak je znázorněno na obrázku 8.

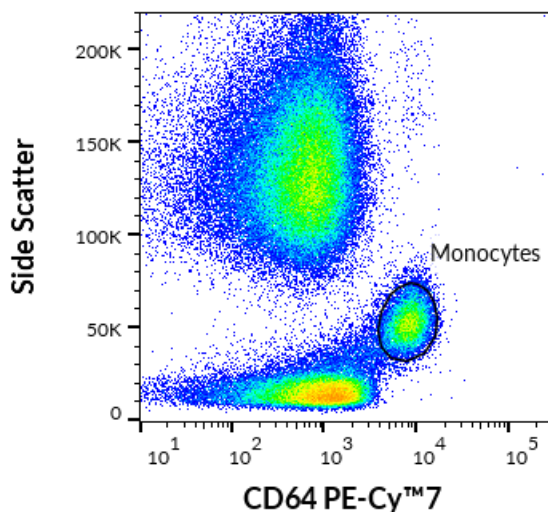
Obrázek 8 Ohraničení CD45+ leukocyte (data získaná na BD FACSCanto™ II).



Monocyty

Zobrazte CD45⁺ leukocyty v grafu side-scatter (SSC) versus CD64 PE-CyTM7 a ohraničte populace CD64⁺ monocytů, jak je znázorněno na obrázku 9.

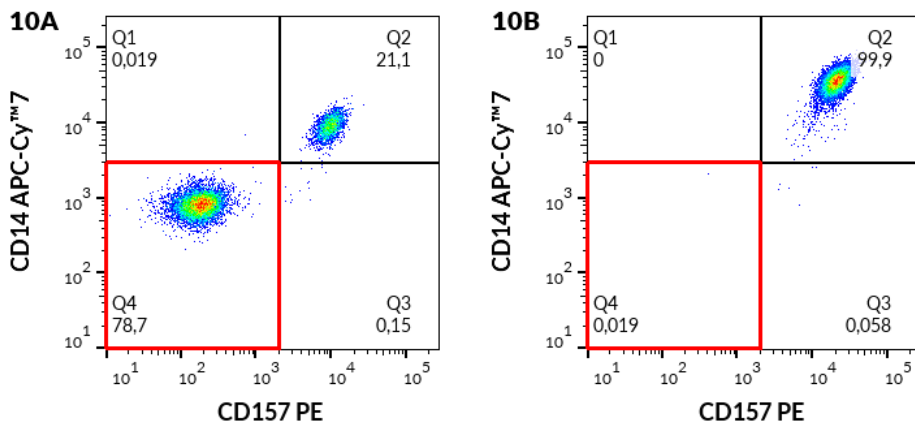
Obrázek 9 Ohraničení CD64⁺ monocytů z leukocyte (data získaná na BD FACSCantoTM II).



Zobrazte CD64+ monocyty v grafu CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (obrázek 10). Nastavte vhodné regiony (gaty) a vypočítejte procento populace CD157-CD14- v kvadrantu Q4.

Obrázek 10 CD64+ monocyty v dot-plot CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (data získaná na BD FACSCanto™ II).

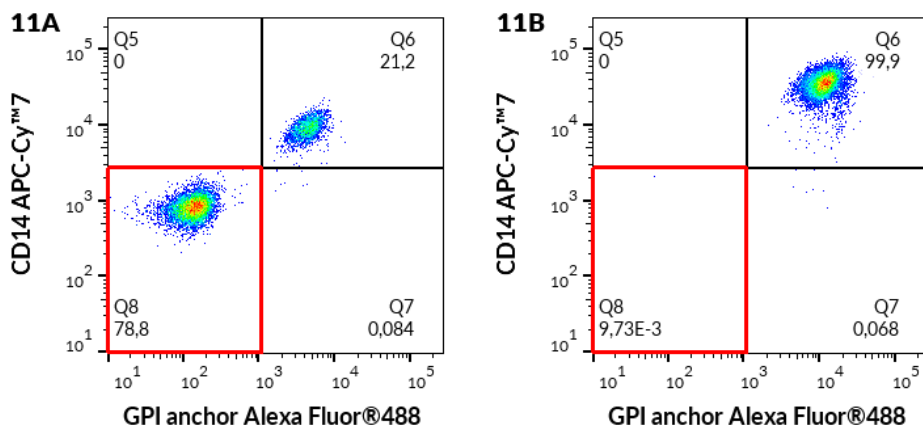
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD64+ monocyty v grafu Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD14 APC Cy™7 (obrázek 11). Nastavte vhodné regiony (gaty) a vypočítejte procento populace GPI kotva- CD14- v kvadrantu Q4.

Obrázek 11 CD64+ monocyty v dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD14 APC Cy™7 (data získaná na BD FACSCanto™ II).

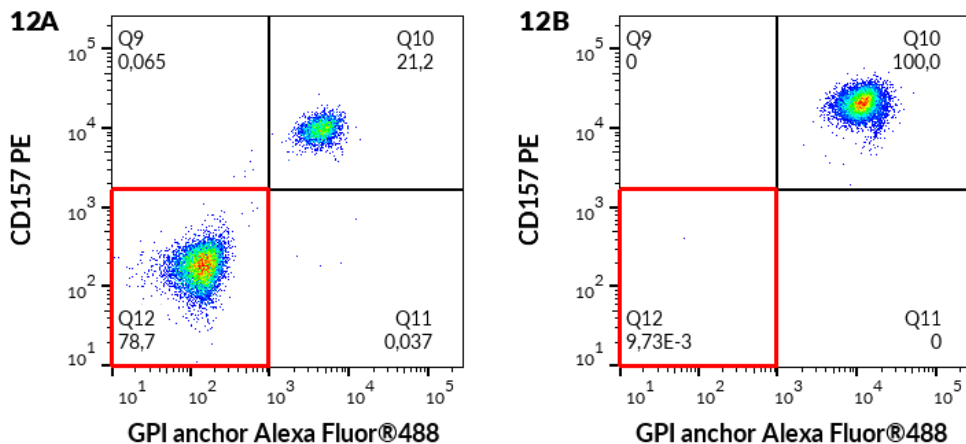
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD64+ monocyty v grafu Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD157 PE (obrázek 12). Nastavte vhodné regiony (gaty) a vypočítejte procento populace GPI kotva- CD157- v kvadrantu Q4.

Obrázek 12 CD64+ monocyty v dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD157 PE (data získaná na BD FACSCanto™ II).

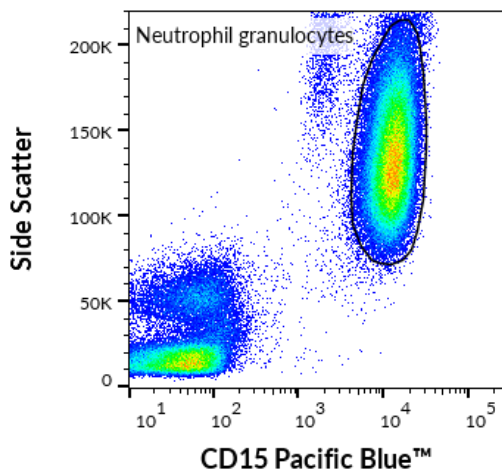
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Neutrofilní granulocyty

Zobrazte CD45+ leukocyty v grafu side-scatter (SSC) versus CD15 Pacific Blue™ a oddělte CD15+ neutrofilní granulocyty, jak je znázorněno na obrázku 13.

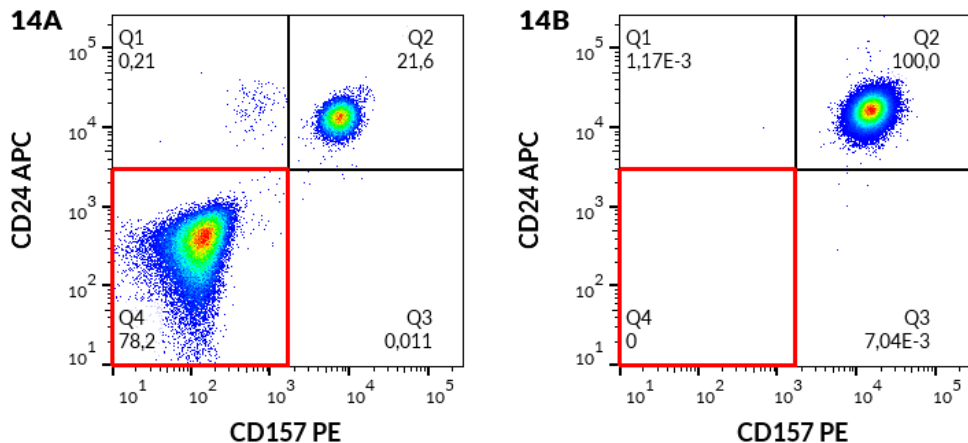
Obrázek 13 Ohraničení CD15+ neutrofilních granulocytů ze všech leukocyte (data získaná na BD FACSCanto™ II).



Zobrazte CD15⁺ neutrofilní granulocyty v grafu CD157 PE versus CD24 APC, jak je znázorněno na obrázku 14. Nastavte vhodné region (gaty) a vypočítejte procento populace CD157-CD24⁻ v kvadrantu Q4.

Obrázek 14 CD15⁺ neutrofilní granulocyty v grafu CD157 PE versus CD24 APC (data získaná na BD FACSCanto™ II).

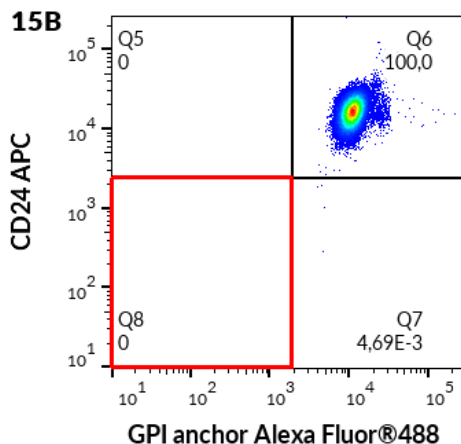
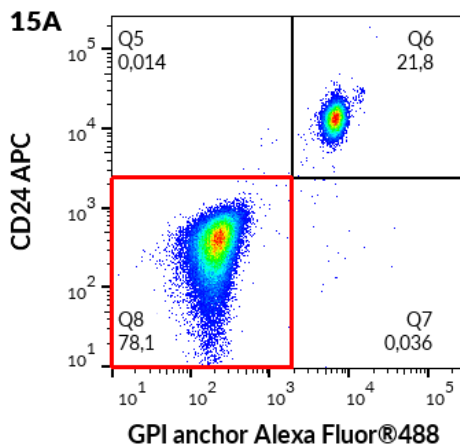
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD15+ neutrofilní granulocyty v grafu Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD24 APC. Nastavte vhodné regiony (gaty) a vypočítejte procento populace GPI kotva- CD24- v kvadrantu Q4, jak je znázorněno na obrázku 15.

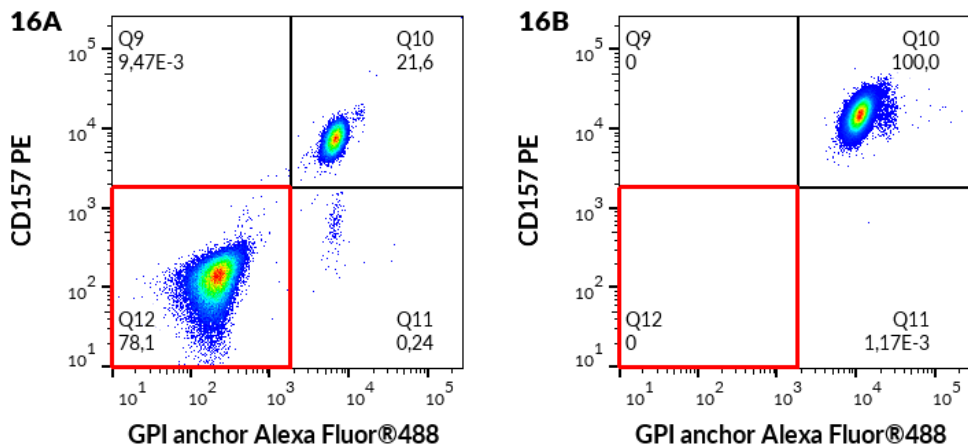
Obrázek 15 CD15+ neutrofilní granulocyty v grafu Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD24 APC (data získaná na BD FACSCanto™ II).

A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD15+ neutrofilní granulocyty v grafu Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD157 PE. Nastavte vhodné regiony (gaty) a vypočítejte procento populace GPI kotva- CD157- v kvadrantu Q4, jak je znázorněno na obrázku 16.

Obrázek 16 CD15+ neutrofilní granulocyty v dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI kotva) versus CD157 PE (data získaná na BD FACSCanto™ II).
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Výpočet a interpretace analytických výsledků

Vypočítejte procentuální zastoupení buněk s deficitem GPI (s PNH fenotypem), viz tabulka 5.

Tabulka 5 Fenotypy PNH klonů

Parentální populace buněk		PNH fenotyp podle nastavení regionů (gatů)
PNH RBC 3-color	Erytrocyty (Typ III)	CD59- CD235a+ (Obr. 5)
	Erytrocyty (Typ II)	CD59 dim CD235a+ (Obr. 5)
	iRBC (Typ III)	CD59- CD235a+CD71+(Obr. 7)
	iRBC (Typ II)	CD59 dim CD235a+CD71+(Obr. 7)
PNH WBC 7-color zkumavka	Monocyty	CD14- CD157- CD64+ (Obr. 10)
		CD14- GPI kotva- CD64+ (Obr. 11)
		CD157- GPI kotva- CD64+ (Obr. 12)
	Neutrofilní granulocyty	CD24- CD157- CD15+ (Obr. 14)
		CD24- GPI kotva- CD15+ (Obr. 15)
		CD157- GPI kotva- CD15+ (Obr. 16)

Tabulka 6 Interpretace výsledků

Limit detekce (cut-off) pro zkumavky WBC a RBC je uvedený jako frekvence z parentální populace (%), vypočtený ze 100 měření z n=25 vzorků normálních pacientů na n=4 různých platformách cytometru				
PNH fenotyp	Průtokový cytometr			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
PNH RBC 3-color zkumavka				
CD59- Typ II a Typ III RBCs	0,005	0,002	0,029	0,049
CD59- Typ II a Typ III iRBC	0,240	0,320	0,388	0,562
PNH WBC 7-color zkumavka				
CD157- CD14- monocyty	0,20	0,19	0,14	0,30
GPI kotva- CD14- monocyty	0,08	0,04	0,10	0,17
GPI kotva- CD157- monocyty	0,07	0,06	0,04	0,03
CD157- CD24- neutrofilní granulocyty	0,02	0,02	0,06	0,03
GPI kotva- CD24- neutrofilní granulocyty	0,03	0,03	0,02	0,02
GPI kotva- CD157- neutrofilní granulocyty	0,01	0,01	0,01	0,01

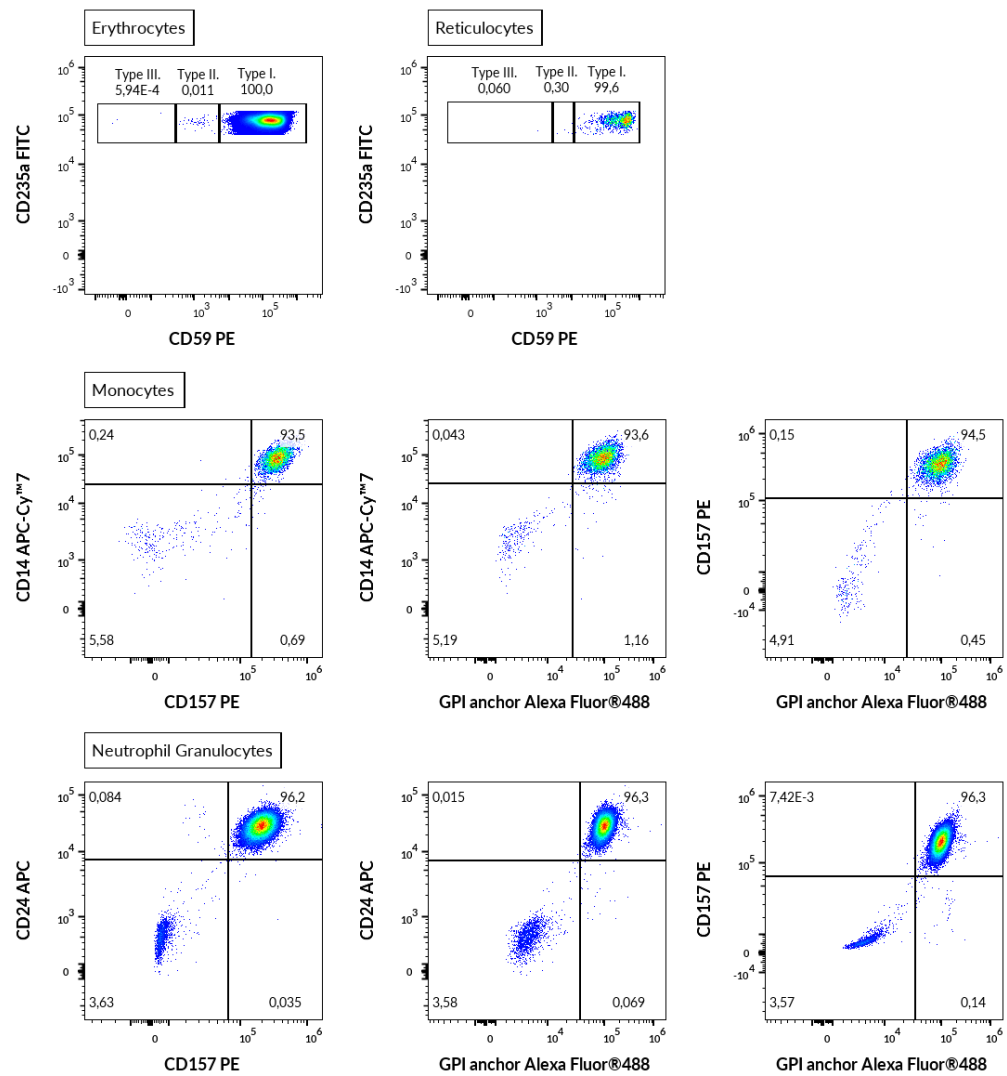
Pravidla algoritmu pro deficit GPI:

1. U pacientů s frekvencí buněčné populace s deficitem GPI **nižší** než limit detekce (tabulka 6), mají být výsledky hlášeny jako: „**granulocyty, monocyty, červené krvinky a iRBC vykazují normální expresi antigenů spojených s GPI. Nebyly zjištěny žádné PNH klony.**“ ⁽¹⁾.
2. U pacientů s frekvencí buněčné populace s deficitem GPI **vyšší** než limit detekce (Tabulka 6) mají být výsledky hlášeny jako: „**granulocyty, monocyty, červené krvinky nebo iRBC vykazují částečný nebo úplný nedostatek antigenů spojených s GPI. PNH klony detekovány.**“

UPOZORNĚNÍ: Klinická laboratoř si musí stanovit vlastní Limit detekce (LOD) / Cut-off ze souboru vzorků od normálních dárců v případě použití jiného typu a/nebo značky cytometru než jsou uvedené v tabulkách 8-11 (viz sekce 11. Vlastností analytické funkce / Limit detekce / Mez detekce metody (Cut-off)).

3. Ve většině případů PNH nemoci vykazují všechny populace cílových buněk WBC přítomnost PNH klonu ^(4, 6, 7, 8). WBC PNH klony se objevují shluklé a méně rozptýlené, než náhodné dvojité negativní události.
4. V některých případech může být přítomnost PNH klonu detekována ve WBC zkumavce, zatímco v RBC zkumavce detekována není, jak je znázorněno na **obrázku 17**. V tomto případě musí být přítomnost PNH klonu hlášena jako **deficit GPI podle pravidla algoritmu 2**.
5. Pokud je detekován jakýkoli PNH klon, vždy uveďte procento všech fenotypů PNH klonů (tabulka 6) z jejich parentální buněčné populace. Monocyty mohou vykazovat větší velikost PNH klonu, než neutrofilní granulocyty ⁽²⁾.
6. Deficit GPI (přítomnost klonu PNH) by měl být vyjádřen ve všech fenotypech PNH v dané podskupině leukocytů. Očekává se, že všechny monocytární PNH fenotypy (tabulka 5) budou barvit buňky s deficitem GPI podobně ⁽⁶⁾. Totéž platí pro neutrofilní fenotypy PNH.

Obrázek 17 Příklad případu s přítomností PNH klonu ve WBC zkuhavce, přičemž PNH klon v RBC zkuhavce detekován nebyl (data získaná na Beckman Coulter DxFLEX).



11. Vlastnosti analytické funkce

Specifická

Proaerolysin Alexa Fluor® 488 je fluorescenčně značená varianta bakteriálního aerolysinu, který se specificky váže na GPI kotvy povrchových membránových proteinů v lidských buňkách ^(1, 2, 5, 8).

Monoklonální protilátka SY11B5 rozpoznává extracelulární epitop na CD157 antigenu exprimovaného hlavně na monocytech a granulocytech. Specifická protilátka byla potvrzena na HCDM Council (HLDA X workshop).

Monoklonální protilátka 2D1 rozpoznává všechny leukocytární izoformy lidského CD45 antigenu (Leukocyte Common Antigen). Specifická protilátka byla potvrzena na HCDM Council (HLDA III workshop).

Monoklonální protilátka 10.1 rozpoznává lidský antigen CD64, který je exprimován na monocytech. Specifická protilátka byla potvrzena workshopy HLDA (HLDA III: workshop WS Code M-250).

Monoklonální protilátka SN3 reaguje s antigenem CD24 exprimovaným granulocyty. Specifická protilátka byla potvrzena workshopem HLDA (HLDA IV: WS kód B 136; HLDA V: WS kód B CD24.7).

Monoklonální protilátka MEM-15 reaguje s CD14, GPI (glykosylfosfatidylinositol)-vázaný extracelulární membránový glykoprotein exprimovaný na monocytech. Specifická protilátka byla potvrzena na HCDM Council (HLDA III: WS kód M 252; HLDA IV: WS kód M 113; HLDA IV: WS kód NL 90; HLDA IV: WS kód T 53; HLDA V: WS kód M MA086 ; HLDA VI: WS Code M MA94 workshop).

Monoklonální protilátka MEM-158 reaguje s CD15, silně exprimovaným na povrchu granulocytů. Specifická protilátka byla potvrzena na HCDM Council (HLDA VI: WS Code AS A053 workshop).

Monoklonální protilátka JC159 rozpoznává epitop na extracelulární části CD235a (glykoforin A), sialoglykoprotein exprimovaný na časných erytroblastech, pozdních erytroblastech, erytroblastech a zralých erytrocytech.

Monoklonální protilátka MEM-43 reaguje s dobře definovaným epitopem na CD59 (Protectin), (GPI)-ukotvený glykoprotein exprimovaný na povrchu všech hematopoetických buněk. Specifická protilátka byla potvrzena workshopem HLDA (HLDA IV: WS kód NL 705; HLDA V: WS kód AS S013; HLDA V: WS kód BP BP345; HLDA V: WS kód T T-103 workshop).

Monoklonální protilátka MEM-75 reaguje s extracelulárním epitopem CD71 antigenu exprimovaného na nezralých iRBC. Specifická protilátka byla potvrzena workshopem HLDA (HLDA IV: WS kód A 45; HLDA V: WS kód T T-165 workshop).

Přesnost

Přesnost metody byla stanovena porovnáním prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit s akreditovanou vlastní klinickou laboratorní metodou paralelním barvením 13 pacientů s potvrzenou přítomností fenotypu PNH. Parametry lineární regresní analýzy jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Lineární regresní analýza pro deficitní GPI buněčné populace (fenotypy PNH) u pacientů s potvrzenou přítomností fenotypů PNH (srovnání prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay s akreditovanou vlastní klinickou laboratorní metodou (koktejl jednobarevných konjugovaných protilátek od různých výrobců a analyzovány pomocí BD FACSCanto™ II))

Subpopulace lymfocytů	n	Směrnice	Intercept	R ²	Rozsah [%]
CD59- CD235a+ Typ III erytrocyty	13	0,99	-0,026	1,00	1,28 – 83,79
CD59- CD235a+ Typ III iRBC	13	0,99	-0,384	1,00	5,97 – 97,78
CD59- CD235a+ Typ II erytrocyty	13	1,00	-0,059	1,00	0,13 – 89,92
CD59- CD235a+ Typ II iRBC	13	0,98	0,141	1,00	0,33 – 74,67
CD157- GPI kotva- CD64+ monocyty	13	1,00	0,060	1,00	2,07 – 99,95
CD157- GPI kotva- CD15+ neutrofilly	13	0,99	0,294	1,00	0,80 – 99,82
CD14- GPI kotva- CD64+ monocyty	13	Nebylo stanoveno			2,04 – 99,96
CD14- CD157- CD64+ monocyty	13	Nebylo stanoveno			2,17 – 99,96
CD24- CD157- CD15+ neutrofilly	13	Nebylo stanoveno			0,80 – 99,83
CD24- GPI kotva- CD15+ neutrofilly	13	Nebylo stanoveno			0,81 – 99,80

n = počet vzorků krve

Limit detekce / Limit kvantifikace / Mez detekce metody (Cut-off)

Limit detekce (LOD) byl stanoven pro každou cílovou populaci (viz tabulka 5) jako průměrná hodnota výsledků od 25 zdravých dárců krve zvýšená o tři směrodatné odchylky od průměru pro 4 různé platformy průtokového cytometru a vyjádřená jako mez detekce metody (Cut-off) v tabulce 8, 9, 10 a 11.

UPOZORNĚNÍ: Klinická laboratoř si musí stanovit vlastní Limit detekce (LOD) / Cut-off ze souboru vzorků od normálních dárců v případě použití jiného typu a/nebo značky cytometru než jsou uvedené v tabulkách 8-11.

Tabulka 8 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Mezní hodnoty pro každý PNH fenotyp spolu s výskytem fenotypu PNH a LOQ získanými na průtokovém cytometru BD FACSLytic™.

PNH fenotyp	BD FACSLytic™					
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	Cut-off (Mean + 3*SD)	LOQ (Mean + 10*SD)
RBC zkumavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)						
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,003	0,001	5 – 48 událostí na 1.000.000 událostí (průměr 25 událostí)	0,005 %	0,012 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,054	0,061	0 – 5 událostí na 3.000 iRBC (průměr 2 událostí)	0,240 %	0,660 %
WBC zkumavka (200.000 získaných událostí)						
CD157- CD14- Monocyty	25	0,076	0,041	2 - 24 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 8 událostí)	0,20 %	0,49 %
GPI kotva- CD14- Monocyty	25	0,021	0,018	0 - 5 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 2 událostí)	0,08 %	0,20 %
GPI kotva- CD157- Monocyty	25	0,014	0,020	0 - 4 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 1 událostí)	0,07 %	0,21 %
CD157- CD24- Neutrofilní granulocyty	25	0,006	0,006	0 - 20 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 5 událostí)	0,02 %	0,07 %
GPI kotva- CD24- Neutrofilní granulocyty	25	0,006	0,008	0 - 29 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 6 událostí)	0,03 %	0,09 %

GPI kotva- CD157- Neutrofilní granulocyty	25	0,002	0,002	0 - 8 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 2 událostí)	0,01 %	0,02 %
--	----	-------	-------	--	---------------	---------------

Tabulka 9 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Mezní hodnoty pro každý PNH fenotyp spolu s výskytem fenotypu PNH a LOQ získanými na průtokovém cytometru BD FACSCanto II™.

PNH fenotyp	BD FACSCanto II™					
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	Cut-off (Mean + 3*SD)	LOQ (Mean + 10*SD)
RBC zkumavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)						
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,0006	0,0004	1 - 12 událostí na 1.000.000 událostí (průměr 6 událostí)	0,002 %	0,004 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,0657	0,0847	0 - 5 událostí na 1.000 iRBC (průměr 1 události)	0,320 %	0,913 %
WBC zkumavka (200.000 získaných událostí)						
CD157- CD14- Monocyty	25	0,085	0,035	2 - 16 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 8 událostí)	0,19 %	0,43 %
GPI kotva- CD14- Monocyty	25	0,086	0,096	0 - 3 události na 10.000 Monocytů (průměr 1 událost)	0,04 %	0,10 %
GPI kotva- CD157- Monocyty	25	0,084	0,019	0 - 7 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 1 události)	0,06 %	0,20 %
CD157- CD24- Neutrofilní granulocyty	25	0,004	0,052	0 - 17 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 5 událostí)	0,02 %	0,06 %
GPI kotva- CD24- Neutrofilní granulocyty	25	0,006	0,010	0 - 32 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 6 událostí)	0,03 %	0,10 %
GPI kotva- CD157- Neutrofilní granulocyty	25	0,002	0,002	0 - 8 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 2 událostí)	0,01 %	0,02 %

Tabulka 10 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Mezní hodnoty pro každý PNH fenotyp spolu s výskytem fenotypu PNH a LOQ získanými na průtokovém cytometru Beckman Coulter Navios EX.

PNH fenotyp	Beckman Coulter Navios EX					
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	Cut-off (Mean + 3*SD)	LOQ (Mean + 10*SD)
RBC zkumavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)						
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,007	0,007	4 – 236 událostí na 1.000.000 událostí (průměr 60 událostí)	0,029 %	0,081 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,087	0,100	0 – 6 událostí na 1.000 iRBC (průměr 1 událostí)	0,388 %	1,092 %
WBC zkumavka (200.000 získaných událostí)						
CD157- CD14-Monocyty	25	0,062	0,027	0 - 23 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 6 událostí)	0,14 %	0,33 %
GPI kotva- CD14-Monocyty	25	0,024	0,006	0 - 10 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 2 událostí)	0,10 %	0,28 %
GPI kotva- CD157-Monocyty	25	0,007	0,011	0 - 6 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 1 událostí)	0,04 %	0,12 %
CD157- CD24-Neutrofilní granulocyty	25	0,012	0,015	0 - 43 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 12 událostí)	0,06 %	0,16 %
GPI kotva- CD24-Neutrofilní granulocyty	25	0,005	0,005	0 - 13 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 5 událostí)	0,02 %	0,05 %
GPI kotva- CD157-Neutrofilní granulocyty	25	0,002	0,002	0 - 10 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 2 událostí)	0,01 %	0,03 %

Tabulka 11 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Mezní hodnoty pro každý PNH fenotyp spolu s výskytem fenotypu PNH a LOQ získanými na průtokovém cytometru Beckman Coulter DxFLEX flow cytometer.

PNH fenotyp	Beckman Coulter DxFLEX					
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	Cut-off (Mean + 3*SD)	LOQ (Mean + 10*SD)
RBC zkumavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)						
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,015	0,012	5 – 48 událostí na 1.000.000 událostí (průměr 25 událostí)	0,049 %	0,129 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,106	0,152	0 – 5 událostí na 10.000 iRBC (průměr 2 událostí)	0,562 %	1,626 %
WBC zkumavka (200.000 získaných událostí)						
CD157- CD14- Monocyty	25	0,092	0,068	0 - 27 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 10 událostí)	0,30 %	0,77 %
GPI kotva- CD14- Monocyty	25	0,053	0,040	0 - 16 událostí na 10.000 Monocytů (průměr 6 událostí)	0,17 %	0,46 %
GPI kotva- CD157- Monocyty	25	0,005	0,009	0 - 1 událost na 10.000 Monocytů (průměr 1 událostí)	0,03 %	0,10 %
CD157- CD24- Neutrofilní granulocyty	25	0,010	0,008	0 - 28 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 10 událostí)	0,03 %	0,09 %
GPI kotva- CD24- Neutrofilní granulocyty	25	0,008	0,006	0 - 20 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 8 událostí)	0,02 %	0,06 %
GPI kotva- CD157- Neutrofilní granulocyty	25	0,002	0,002	0 - 5 událostí na 100.000 Neutrofilů (průměr 2 událostí)	0,01 %	0,02 %

POZNÁMKA: Pro analýzu průtokovou cytometrií byly použity následující průtokové cytometry včetně verze softwaru:

BD FACSCanto™ II	BD FACSDiva Software – verze 8.0.2
BD FACSLytic™	BD FACSuite™ Software – verze v1.5.0.925
Beckman Coulter DxFLEX	CytExpert for DxFLEX – verze 2.0.2.18
Beckman Coulter Navios EX	Navios EX Software – verze 2.2

Pro vyhodnocení naměřených dat byla použita následující analytická platforma:
FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - verze 10.9.0

12. Vlastnosti klinické funkce

Pacienti s deficitem GPI

Klinická data byla shromážděna na klinickém místě od 19 pacientů, jak zdravých ⁽⁶⁾, tak pacientů s potvrzeným deficitem GPI ⁽¹³⁾. Vlastnosti klinické funkce byly stanoveny jako srovnání prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit s akreditovanou vlastní klinickou laboratorní metodou (koktejl jednobarevných konjugovaných protilátek od různých výrobců a analyzovaných pomocí BD FACSCanto™ II).

Deficit GPI u pacientů byl hodnocen s ohledem na použitou metodu (tabulka 12) s pomocí detekce buněk s deficitem GPI (PNH klony).

Tabulka 12 Klinická funkce prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Hodnocení deficitu GPI pomocí akreditované vlastní klinické laboratorní metody	
		Deficit GPI	Normální stav
Hodnocení deficitu GPI pomocí prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Deficit GPI	13 pacientů	0 pacientů
	Normální stav	0 pacientů	6 pacientů

13. Očekávané hodnoty

Reference Interval

V normální populaci není detekován žádný nedostatek GPI a očekává se, že všechny procentuální hodnoty fenotypu PNH budou nižší, než mezní hodnota testu (LOD) ⁽⁶⁾.

14. Omezení

Nebyla zjištěna žádná omezení pro použití u specifických typů onemocnění, jako např. anémie.

Reportování záchyty GPI deficiencie je limitováno současným stavem poznání uvedeným v publikovaných pokynech ⁽⁶⁾.

15. Odkazy

- 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 et al. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012 Jul;82(4):195-208. doi: 10.1002/cyto.b.21023. Epub 2012 Apr 25.
- 3) Marinov, I et al. 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.
- 4) Dezern, AE et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 – clinical utility. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jan;94(1):16-22. doi: 10.1002/cyto.b.21608.
- 5) Sutherland, DR et al. 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 et al. 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 et al. 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 et al. 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. Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti

Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti bude k dispozici v databázi Eudamed na adrese <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Do té doby je souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti k dispozici na vyžádání.

17. Použití ochranných známek třetích stran

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™ a FlowJo™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson a Company. Cy™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytiva. VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L.. SPHERO™ COMPtrol je registrovaná ochranná známka firmy Spherotech, Inc..

18. Historie revizí

Verze 2, ED7750_IFU_v2

- 1) Přidána endogenní a exogenní interference.
- 2) Sekce “Pravidla algoritmu pro deficit GPI” byla aktualizována.
- 3) Kapitola 13. Očekávané hodnoty – drobné opravy textu.
- 4) Aktualizace referencí.
- 5) Doplnění identifikačního čísla notifikované osoby.
- 6) Doplnění nové kapitoly číslo 16. Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti.

19. Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

Kontaktní informace

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

20. Zplnomocněný zástupce

N/A

POZNÁMKA: Jakákoli vážná událost, která se vyskytla v souvislosti s prostředkem, musí být oznámena výrobcí a místnímu příslušnému úřadu.