

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

25 Tests | Kat. Nr. ED7750



Gebrauchsanweisung (DE)

Version: ED7750_IFU_v1_DE

Ausgabedatum: 22-03-2023

In der Gerätekenzeichnung verwendete Symbole

	Medizinisches Produkt für die In-vitro-Diagnose		Von Sonneneinstrahlung fernhalten
	CE-Kennzeichnung		Trocken aufbewahren
	Hersteller		Achtung
	Eindeutige Gerätekennung		Nur für den einmaligen Gebrauch
	Gebrauchsanweisung beachten		Enthält <n> Röhrchen für Einwegtests
	Ausreichend für <n> Tests		Konzentrierte Lösung (10x)
	Katalognummer		Inhalt
	Chargencode		UKCA-Zeichen
	Verfallsdatum		
	Temperaturgrenze		

1. Verwendungszweck

Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit ist für den hochempfindlichen Nachweis und die Zählung von Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-defizienten Zellen im menschlichen Vollblut mittels Durchflusszytometrie vorgesehen.

Was wird nachgewiesen und/oder gemessen?

Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit erkennt und zählt Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-defiziente Zellen (PNH-Klone) als Prozentsatz von:

- CD59 dim oder CD59- Zellen aus allen Erythrozyten (CD235a+)
- CD59 dim oder CD59- Zellen aus allen Retikulozyten (CD235a+CD71+)
- CD14-, CD157- und GPI Ankerzellen aus allen Monozyten (CD45+CD64+)
- CD24-, CD157- und GPI Ankerzellen aus allen neutrophilen Granulozyten (CD45+CD15+)

Funktion des Produkts

Das Gerät ist für die Diagnose und Überwachung von Patienten vorgesehen, die an paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH) und verwandten Erkrankungen leiden oder bei denen der Verdacht besteht, dass sie daran leiden ⁽¹⁾.

Kontext eines physiologischen oder pathologischen Zustands

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine seltene Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen, die als Folge der nicht bösartigen klonalen Expansion von Zellen mit somatischer Mutation des Phosphatidylinositol-Glycan-Anker-Biosynthese-Klasse-A(PIGA)-Gens entsteht. Mutationen des PIGA-Gens führen dazu, dass Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-verankerte Zelloberflächenproteine nicht exprimiert werden können.

Das Gerät soll GPI-defiziente neutrophile Granulozyten und Monozyten ⁽¹⁾ sowie vollständige (Typ III) und teilweise (Typ II) GPI-defiziente Erythrozyten ^(2,3,4,5,6) zur Beurteilung der PNH-Klongröße erkennen.

Darüber hinaus erkennt das Gerät GPI-defiziente Retikulozyten (unreife Erythrozyten) bei Patienten, die Bluttransfusionen erhalten, wenn PNH-Erythrozyten schwer abzugrenzen sind ⁽⁷⁾.

Art des Tests

Nicht automatisiert

Quantitativ

Art der benötigten Probe

Humane antikoagulierte periphere Vollblutprobe (EDTA, Heparin, Citrat) ⁽¹⁾

Testpopulation

Patienten mit:

- Labormarker für Hämolyse, wenn andere häufigere Ursachen für Hämolyse ausgeschlossen wurden,
- ungeklärte Thrombosen im jungen Alter,
- diagnostizierte Thrombosen an einer ungewöhnlichen Stelle,
- vererbte oder erworbene aplastische Anämie (AA),
- myelodysplastisches Syndrom (MDS),
- ungeklärte Zytopenie, bei der AA oder MDS differenzialdiagnostisch in Frage kommen ⁽¹⁾

2. Vorgesehener Benutzer

Das Gerät ist nur für den professionellen Einsatz im Labor bestimmt. Nicht für patientennahe Tests oder Selbsttests geeignet.

Anforderungen an die Qualifikation

Der vorgesehene Benutzer muss über aktuelle Fachkenntnisse in der Durchflusszytometrie-Analyse menschlicher Zellen, standardmäßige Labortechniken, einschließlich Pipettieren, sowie den sicheren und korrekten Umgang mit Proben aus dem menschlichen Körper verfügen.

Der vorgesehene Benutzer muss die Norm EN ISO 15189 oder ggf. andere nationale Normen einhalten.

3. Testprinzip

Das Testprinzip basiert auf dem Nachweis von GPI-Anker und GPI-verankerten Proteinen auf der Oberfläche menschlicher Blutzellen. Die in dem Test verwendeten monoklonalen Antikörper und das rekombinante Proaerolysin sind mit verschiedenen Fluorochromen markiert, die durch einen Laserstrahl eines Durchflusszytometers während der Erfassung einer gefärbten Blutprobe angeregt werden. Die anschließend erzeugte Fluoreszenz (Lichtemission) der einzelnen Fluorochrome auf einer aufgenommenen Blutzelle wird vom Gerät erfasst und analysiert. Die Stärke der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Dichte der Antigenexpression in einer Zelle und ermöglicht die Trennung verschiedener Zelluntergruppen.

4. Bereitgestellte Reagenzien

Inhalt

Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, das für die Untersuchung von 25 Patienten ausreicht, wird mit den folgenden Reagenzien geliefert:

PNH High-Sensitivity Assay (25 Beutel). Jeder Beutel enthält ein farbcodiertes (cyanfarbener Streifen) verschlossenes Einwegröhrchen **PNH WBC 7-color**

(ED7750-1) und ein farbcodiertes (roter Streifen) verschlossenes Einwegröhrchen **PNH RBC 3-color** (ED7750-2) mit vorgemischten Kombinationen aus Fluorochrom-markierten Reagenzien, die mit den stabilisierenden Bestandteilen als Schicht am Boden der Teströhrchen (12 x 75 mm) getrocknet sind (siehe Tabelle 1 und 2).

Lysing Solution ED7750-3 (1 Flasche) enthält 15 ml konzentrierte (10X) gepufferte Lösung auf Formaldehydbasis.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 Beutel) mit 10 verschlossenen Einwegröhrchen, die jeweils ein einzelnes Fluorochrom-markiertes Reagenz enthalten, getrocknet mit den stabilisierenden Bestandteilen als Schicht am Boden des Röhrchens (12 x 75 mm).

VORSICHT: Das PNH Compensation Set ist nur für die Einrichtung der Kompensation bestimmt. Einzelne Fluorochrom-markierte Reagenzien (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2) ermöglichen ein einfaches und genaues Kompensationsverfahren.

Zusammensetzung

Tabelle 1 Beschreibung der Wirkstoffe von PNH WBC 7-color

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp
GPI- Anker (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

Tabelle 2 Beschreibung der Wirkstoffe von PNH RBC 3-color

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

5. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Deionisiertes Wasser (Reagenzienqualität)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1x PBS), pH 7,2-7,4

Durchflusszytometrie-Kompensationspartikel (Spherotech SPHERO™ COMPtrol Kit, Kat.- Nr. CM1gP-50-3K oder gleichwertige Kompensationspartikel)

6. Erforderliche Ausrüstung

Automatische Pipette mit Einwegspitzen (100 µl – 5 ml) zum Pipettieren der Proben und Reagenzien

Flüssigkeitsspender oder Pipette mit Einwegspitzen (2 ml) für die Abgabe der Erythrozytenlyselösung

Vortex-Mixer

Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (15 ml oder 50 ml) zur Probenvorbereitung

Zentrifuge mit passenden Rotoradaptern für 12 x 75 mm Rundbodenröhrchen

Durchflusszytometer mit drei Laseranregungsquellen (488 nm, ca. 635 nm und 405 nm), Detektoren für Streulicht, optische Filter und Emissionsdetektoren, die für die Erfassung der Signale der in Tabelle 3 aufgeführten Fluorochrome ausgelegt sind.

Tabelle 3 Spektrumscharakteristik der in dem Gerät verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Anregung [nm]	Emission [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

HINWEIS: Das Gerät wurde auf folgenden Durchflusszytometern getestet: BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter) und DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Lagerung und Handhabung

Bei 20–30 °C aufbewahren.

Längere Lichteinwirkung vermeiden.

Trocken aufbewahren.



VORSICHT: Feuchtigkeitsempfindliches Produkt. Den Folienbeutel erst bei der ersten Verwendung öffnen.

Siehe Abschnitt 10 Verfahren (Vorbereitung der bereitgestellten Reagenzien) für Informationen zu den Lagerbedingungen und der Stabilität von Arbeitslösungen (sofern zutreffend).

8. Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen bei der Anwendung

GHS-Gefahrenklassifizierung

WARNUNG: Lysing solution (ED7750-3) mit Formaldehyd (CAS-Nr. 50-00-0) und Methanol (CAS-Nr. 67-56-1) in als gefährlich eingestuft Konzentrationen.

Etikettenelemente	Signalwort
	Gefahr
	
H-Sätze	H315: Verursacht Hautreizungen. H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H335: Kann die Atemwege reizen. H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. H350: Kann Krebs erzeugen. H371: Kann die Organe schädigen. H373: Kann die Nieren schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition. H302+H312+H332: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
P-Sätze	P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P260: Dampf nicht einatmen. P264: Nach Gebrauch Hände und freiliegende Körperteile gründlich waschen. P280: Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein

GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. P302+P352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P314: Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P333+P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362+P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
--

Beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheet/SDS) auf der Produktseite auf www.exbio.cz. Dort finden Sie alle Informationen zu den Risiken, die von den im Produkt enthaltenen chemischen Stoffen und Gemischen ausgehen, und dazu, wie diese gehandhabt und entsorgt werden sollten.

Biologisches Risiko

Menschliche biologische Proben und Blutproben sowie alle damit in Kontakt kommenden Materialien werden immer als infektiöses Material betrachtet.

Verwenden Sie eine persönliche Schutz- und Sicherheitsausrüstung, um den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten zu vermeiden.

Befolgen Sie alle geltenden Gesetze, Vorschriften und Verfahren für den Umgang mit und die Entsorgung von infektiösem Material.

Anzeichen von Verfall

Das mitgelieferte Reagenz ist normalerweise eine transparente, getrocknete Schicht auf dem Boden des Röhrchens. Verwenden Sie das Reagenz nicht, wenn Sie eine Veränderung des Aussehens feststellen, z. B. Feuchtigkeit im Inneren des Röhrchens.

Beschränkung der Verwendung

Do not use after the expiry date stated on the product labels.

Teströhrchen nicht wiederverwenden.

9. Probe

Verwenden Sie venöses peripheres Blut, das in einem als Medizinprodukt eingestuftem Probenbehälter mit dem Antikoagulans EDTA, Heparin oder ACD (Acid Citrat Dextrose) entnommen wurde ⁽²⁾.

Die Blutprobe im Entnahmeröhrchen muss bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Nicht im Kühlschrank aufbewahren.

Nur unbehandelte Proben verwenden. Keine vorlysierten, gewaschenen oder verdünnten Proben verwenden.

Verarbeiten Sie die Blutprobe spätestens 48 Stunden nach der Entnahme ⁽²⁾.

10. Vorgehensweise

Vorbereitung der mitgelieferten Reagenzien

PNH High-Sensitivity Assay

Es ist keine Vorbereitung der Reagenzien erforderlich, sie werden in Teströhrchen zum einmaligen Gebrauch geliefert.

Lysing Solution

Verdünnen (10X) Sie die Lyselösung mit deionisiertem Wasser gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die verdünnte (1X) Lyselösung ist 1 Monat lang haltbar, wenn sie in einem Flüssigkeitsspendler oder einem geschlossenen Behälter bei Raumtemperatur aufbewahrt wird.

Vorbereitung der erforderlichen, aber nicht bereitgestellten Materialien

Kompensationspartikel

Bereiten Sie die Arbeitslösung der Durchflusszytometrie-Kompensationspartikel gemäß den Anweisungen des Herstellers vor.

Einrichtung der Kompensation

Nehmen Sie die Röhrchen des Kompensationssets mit demselben Durchflusszytometer-Setup auf, bevor Sie die mit PNH RBC 3-color und PNH WBC 7-color gefärbten Röhrchen analysieren.

VORSICHT: Die Kompensationsverfahren für PNH RBC 3-color und PNH WBC 7-color unterscheiden sich in der Art der Probenvorbereitung und Probenfärbung.

PNH RBC 3-color Kompensationsröhrchen (roter Streifen)

1. Geben Sie das SPHERO™ COMPtrol Kit oder gleichwertige Kompensationspartikel in den Boden der einzelnen einfarbigen Kompensationsröhrchen.
2. Vortexen Sie und inkubieren Sie für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
3. Geben Sie 4 ml 1X PBS in jedes Kompensationsröhrchen. 5 Minuten bei 300×g zentrifugieren.
4. Verwerfen Sie den Überstand, ohne die Kompensationspartikel zu beeinträchtigen, und geben Sie 0,1 ml 1X PBS in jedes Kompensationsröhrchen.

5. Stellen Sie vor der Analyse der gefärbten Proben die Spannungen an den entsprechenden Fluoreszenzdetektoren ein. Die Spannung am PMT-Detektor sollte ausreichend hoch eingestellt sein, damit möglichst wenige negativ gefärbte Ereignisse den 0. Kanal auf der Fluoreszenzachse stören. Außerdem sollte die Spannung des PMT-Detektors nicht die Werte überschreiten, bei denen positive Ereignisse auf die rechte Achse gedrückt werden.
6. Messen Sie die Kompensationsröhrchen sofort mit dem Durchflusszytometer.
7. Berechnen Sie die Kompensationsmatrix für PNH RBC 3-color entweder in der vom Hersteller entwickelten Zytometersoftware oder in einer speziellen Software für die Offline-Analyse von Zytometriedaten. Verwenden Sie diese Kompensationsmatrix für alle Teströhrchen dieser Charge von PNH RBC 3-color.

VORSICHT: Sobald Sie die Einstellungen für eine bestimmte Charge von PNH RBC 3-color vorgenommen haben, sollten Sie die Einstellungen der Fluoreszenzdetektoren nicht mehr ändern, um die gleichen Einstellungen für die Erfassung der Kompensationsmatrix und die Kompensationsergebnisse beizubehalten.

PNH WBC 7-color Kompensationsröhrchen (cyanfarbener Streifen)

1. Geben Sie 50 µl entionisiertes Wasser in den Boden jedes einfarbigen Kompensationsröhrchens und vortexen Sie 7–10 Sekunden lang kräftig.
2. Geben Sie 100 µl peripheres Vollblut in jedes einfarbige Kompensationsröhrchen und vortexen Sie kräftig.
3. 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
4. Geben Sie 2 ml verdünnte (1X) Lyselösung in jedes Kompensationsröhrchen.
5. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
6. Zentrifugieren Sie es für 5 Minuten bei 300×g, werfen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Zellpellet in 2 ml 1X PBS.
7. Zentrifugieren Sie es für 5 Minuten bei 300×g, werfen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Zellpellet in 0,2 ml 1X PBS.
8. Stellen Sie vor der Analyse der gefärbten Proben die Spannungen an den entsprechenden Fluoreszenzdetektoren ein. Die Spannung am PMT-Detektor sollte ausreichend hoch eingestellt sein, damit möglichst wenige negativ gefärbte Ereignisse den 0. Kanal auf der Fluoreszenzachse stören. Außerdem sollte die Spannung des PMT-Detektors nicht die Werte überschreiten, bei denen positive Ereignisse auf die rechte Achse gedrückt werden.

9. Messen Sie die Kompensationsröhrchen sofort mit dem Durchflusszytometer.
10. Berechnen Sie die Kompensationsmatrix für PNH WBC 7-color entweder in der vom Hersteller entwickelten Zytometersoftware oder in einer speziellen Software für die Offline-Analyse von Zytometriedaten. Verwenden Sie diese Kompensationsmatrix für alle Teströhrchen dieser Charge von PNH WBC 7-color.

VORSICHT: Sobald Sie die Einstellungen für eine bestimmte Charge von PNH WBC 7-color vorgenommen haben, sollten Sie die Einstellungen der Fluoreszenzdetektoren nicht mehr ändern, um die gleichen Einstellungen für die Erfassung der Kompensationsmatrix und die Kompensationsergebnisse beizubehalten.

Probenvorbereitung

Nachweis und Differenzierung von PNH-Klonen in Erythrozyten mittels PNH RBC 3-color-Röhrchen erfordern vor dem Färbevorgang eine Probenvorbereitung.

HINWEIS: Stellen Sie vor der Verarbeitung der Probe sicher, dass das Zytometer ordnungsgemäß eingerichtet wurde.

1. Kennzeichnen Sie ein konisches Polypropylenröhrchen mit der Identifizierung der untersuchten Blutprobe.
2. Pipettieren Sie 10 µl der gründlich gemischten Blutprobe auf den Boden des gekennzeichneten konischen Röhrchens.
3. Verdünnen Sie die Blutprobe 1:100 mit 1 ml 1X PBS und mischen Sie sie 5 Sekunden lang mit der Hand.

VORSICHT: Bei der klassischen Form der PNH dominiert die intravaskuläre Hämolyse. Ziehen Sie vor der Verdünnung der Blutprobe die Erythrozytenzahlen des Hämatologie-Analysegeräts heran, um eine Erythrozytenzahl in der verdünnten Blutprobe im Bereich von $3-5 \times 10^7$ / ml verdünntem Blut zu erreichen, und passen Sie den Verdünnungsfaktor nach Bedarf an, um eine ausreichende Anzahl von Erythrozyten im Durchflusszytometer zu erhalten.

4. Fahren Sie unmittelbar nach der Probenverdünnung mit dem Verfahren zur Probenfärbung fort.

Nachweis von GPI-defizienten Zellen in neutrophilen Granulozyten und Monozyten mittels PNH WBC 7-color-Röhrchen erfordern vor dem Färbevorgang keine Probenvorbereitung.

Probenfärbung – PNH RBC 3-color-Röhrchen (roter Streifen)

1. Kennzeichnen Sie das PNH RBC 3-color-Röhrchen mit der Identifizierung der untersuchten Blutprobe.
2. Pipettieren Sie 50 µl der gründlich gemischten und verdünnten Blutprobe in den Boden des PNH RBC 3-color-Röhrchens.

VORSICHT: Pipettieren Sie das Blut nicht auf die Seiten des Teströhrchens. Bleibt ein Blutausrich oder -tropfen an der Seite des Röhrchens zurück, wird er nicht mit dem Reagenz gefärbt und die Testergebnisse sind unter Umständen nicht gültig.

3. Vortexen Sie kräftig für 7–10 Sekunden.
VORSICHT: Bei einer Verkürzung der Vortex-Zeit können die Testergebnisse beeinträchtigt werden.
4. Das PNH RBC 3-color-Röhrchen 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
5. Geben Sie 4 ml 1X PBS in das PNH RBC 3-color-Röhrchen.
6. Zentrifugieren Sie das PNH RBC 3-color-Röhrchen für 5 Minuten bei 300×g.
7. Verwerfen Sie den Überstand, ohne das Zellpellet zu beeinträchtigen, und geben Sie 0,5 ml 1X PBS in das PNH RBC 3-color-Röhrchen.
8. Vortexen Sie kurz, um das Zellpellet zu resuspendieren.

Messen Sie die gefärbte Probe mit dem Durchflussszytometer. Wird die gefärbte Probe nicht sofort gemessen, verschließen Sie das Teströhrchen, lagern Sie sie bei 2–8 °C im Dunkeln und analysieren Sie sie innerhalb von 2 Stunden.

VORSICHT: Brechen Sie Zellaggregate in der gefärbten Probe auf, indem Sie das Teströhrchen unmittelbar vor der Erfassung auf dem Durchflussszytometer gegen das Röhrchengestell schieben. Eine übermäßige Menge an Erythrozytenaggregaten kann die Testergebnisse beeinträchtigen.

Probenfärbung – PNH WBC 7-color-Röhrchen (cyanfarbener Streifen)

1. Kennzeichnen Sie das PNH WBC 7-color-Röhrchen mit der Identifizierung der untersuchten Blutprobe.
2. Geben Sie 50 µl entionisiertes Wasser in das PNH WBC 7-color-Teströhrchen. Vortexen Sie kräftig für 7–10 Sekunden.

VORSICHT: Bei einer Verkürzung der Vortex-Zeit können die Testergebnisse beeinträchtigt werden.

3. Pipettieren Sie 100 µl der gründlich gemischten Blutprobe in den Boden des

PNH WBC 7-color-Röhrchens und vortexen Sie kräftig.

VORSICHT: Pipettieren Sie das Blut nicht auf die Seiten des Teströhrchens. Wenn ein Blutausrich oder -tropfen an der Seite des Teströhrchens verbleibt, wird er nicht mit dem Reagenz gefärbt und die Testergebnisse sind unter Umständen nicht gültig.

4. 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
5. Geben Sie 2 ml der 1X Erythrozyten-Arbeitslyselösung zum Lysieren von Erythrozyten in das PNH WBC 7-color-Röhrchen.
6. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
7. Zentrifugieren Sie das PNH WBC 7-color-Röhrchen für 5 Minuten bei 300×g.
8. Verwerfen Sie den Überstand, ohne das Zellpellet zu beeinträchtigen, und geben Sie 2 ml 1X PBS in das Teströhrchen.
9. Zentrifugieren Sie das PNH WBC 7-color-Röhrchen für 5 Minuten bei 300×g.
10. Verwerfen Sie den Überstand, ohne das Zellpellet zu beeinträchtigen, und geben Sie 0,2 ml 1X PBS in das Teströhrchen.
11. Vortexen Sie kurz, um das Zellpellet zu resuspendieren.

Messen Sie die gefärbte Probe mit dem Durchflusszytometer. Wird die gefärbte Probe nicht sofort gemessen, verschließen Sie das Teströhrchen, lagern Sie sie bei 2–8 °C im Dunkeln und analysieren Sie sie innerhalb von 24 Stunden.

Durchflusszytometrie-Analyse

Das für die Verwendung mit dem DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit ausgewählte Durchflusszytometer muss routinemäßig mit fluoreszierenden Mikrokügelchen kalibriert werden, um eine stabile Empfindlichkeit der Detektoren gemäß den Anweisungen des Herstellers des Zytometers sicherzustellen.

Bei unsachgemäßer Wartung kann das Durchflusszytometer falsche Ergebnisse liefern.

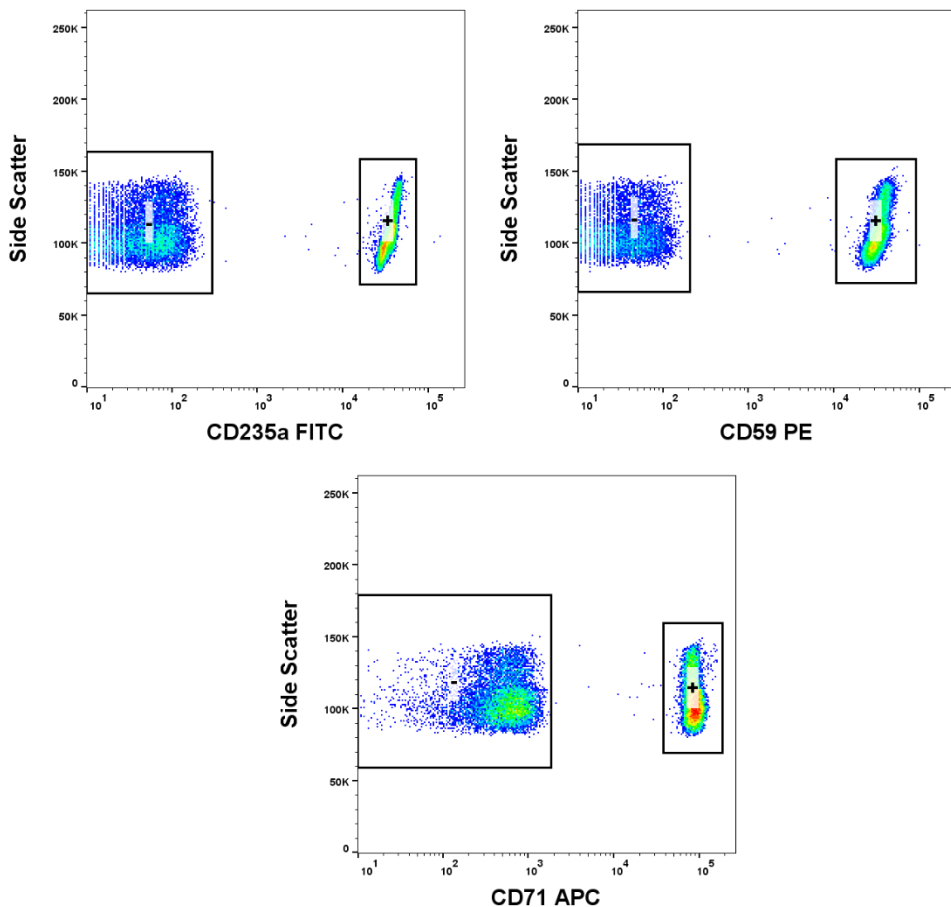
Beachten Sie die Herstellerangaben des Zytometers für Laser und Fluoreszenzdetektoren entsprechend den Anregungs- und Emissionscharakteristiken der Fluorochrome in Abschnitt 6 „Erforderliche Ausrüstung“.

Zur Analyse der Messdaten können die vom Hersteller entwickelte Zytometer-Software oder eine spezielle Software für die Offline-Analyse von Zytometriedaten verwendet werden (z. B. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analyse von PNH RBC 3-color Kompensationsröhrchen (roter Streifen)

Stellen Sie die nicht kompensierten Daten für jedes Kompensationsröhrchen in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung (SSC) gegen das zu kompensierende Fluorochrom dar. Setzen Sie die Gates für positive (+) und negative (-) Zytometrie-Kompensationspartikel wie in Abbildung 1 gezeigt.

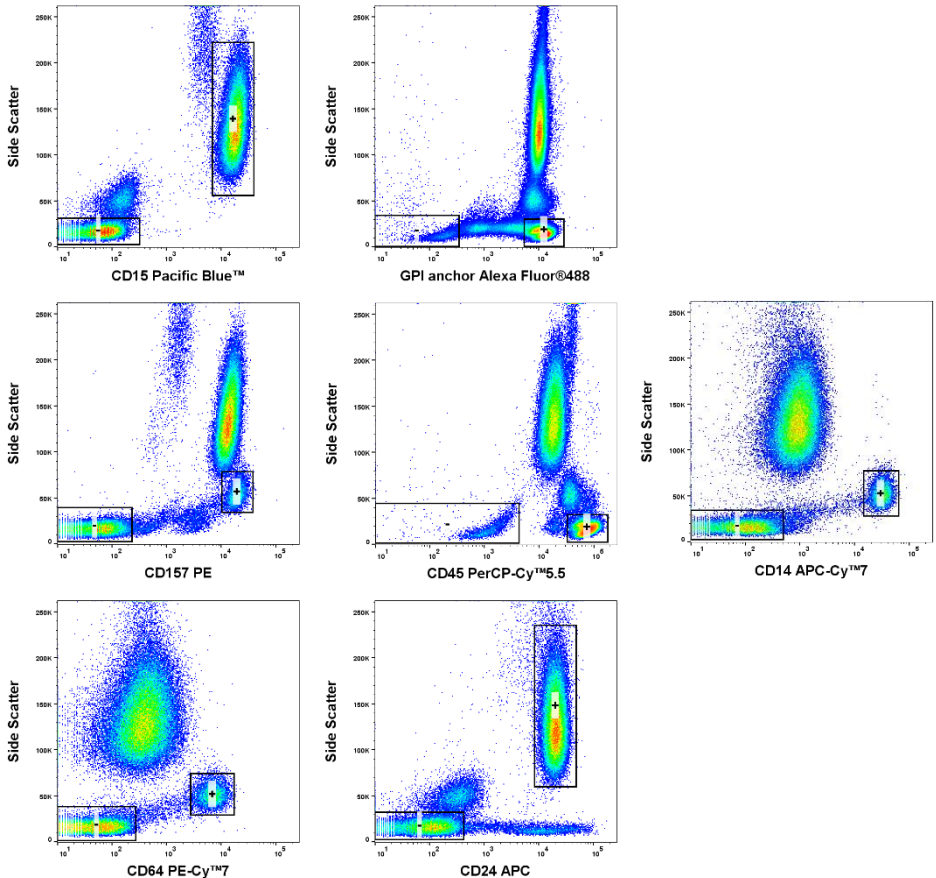
Abbildung 1 Identifizierung von positiven (+) und negativen (-) Zytometrie-Kompensationspartikeln in Kompensationsröhrchen (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



Analyse von PNH WBC 7-color Kompensationsröhrchen (cyanfarbener Streifen)

Stellen Sie die nicht kompensierten Daten für jedes Kompensationsröhrchen in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung (SSC) gegen das zu kompensierende Fluorochrom dar. Setzen Sie die Gates für die positivsten (+) und negativsten (-) Populationen wie in Abbildung 2 gezeigt.

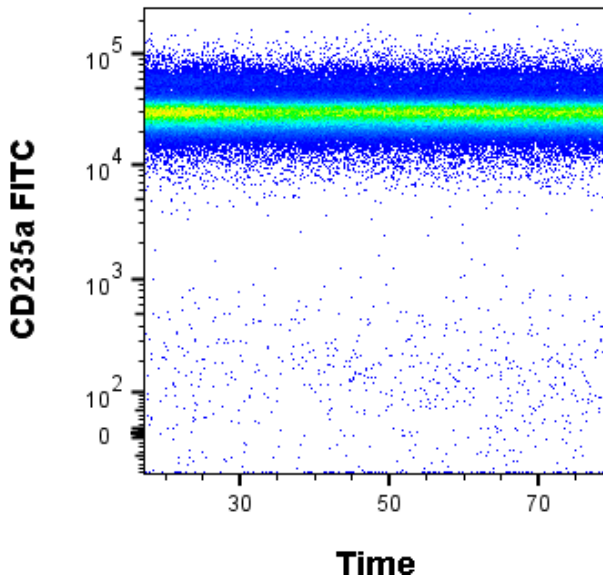
Abbildung 2 Identifizierung der positivsten (+) und negativsten (-) Ereignisse in Kompensationsröhrchen (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



PNH RBC 3-color-Röhrchen (roter Streifen)

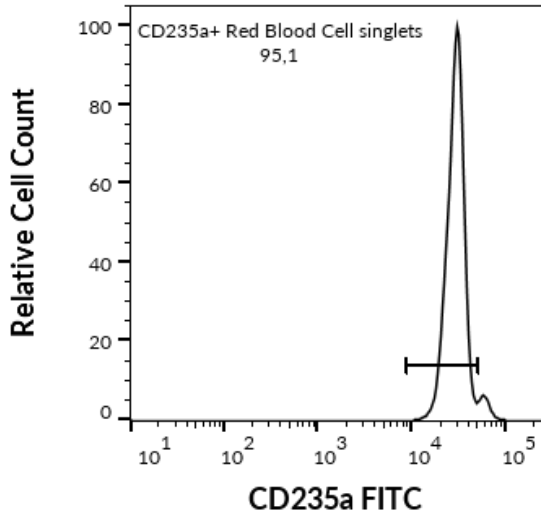
Aufgrund der geringen Retikulozytenzahl in verdünnten Blutproben sollten 500.000 bis 1.500.000 Erythrozytenereignisse zur Analyse erfasst werden. Die Erfassung von ≥ 500.000 Ereignissen führt zu langen Erfassungszeiten. Dies kann das Gleichgewicht des Antikörper-Antigen-Bindungskomplexes und die Abnahme der CD235a-FITC-Fluoreszenz beeinträchtigen. Überwachen Sie stets die Stabilität der Fluoreszenzintensität über die Erfassungszeit (Abbildung 3).

Abbildung 3 Alle erfassten Ereignisse in einem Punktdiagramm CD235a FITC vs. Zeit (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



Stellen Sie kompensierte Daten als Histogramm dar, wobei die X-Achse die Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal wiedergibt. Setzen Sie das Gate „CD235a+ RBC-Singulett“ (Abbildung 4).

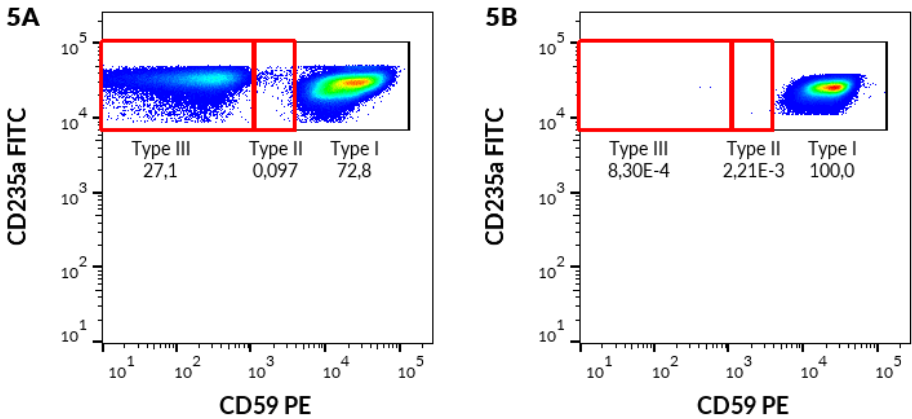
Abbildung 4 Abgrenzung von CD235a+ RBC-Singulett (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



Erythrozyten

Stellen Sie CD235a+ RBC-Singulettten in einem Punktdiagramm von CD59 PE vs. CD235a FITC dar. Teilen Sie die Ereignisse mithilfe von drei geeigneten Gates in drei Populationen auf (Abbildung 5) und berechnen Sie den Prozentsatz der Ereignisse in den Regionen Typ I, Typ II und Typ III.

Abbildung 5 CD235a+ RBC-Singulettten in einem Punktdiagramm CD59 PE vs. CD235a FITC (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender.

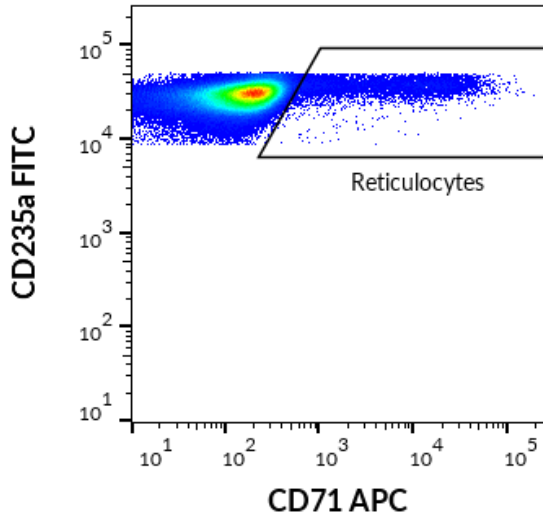


Retikulozyten

Stellen Sie CD235a+ RBC-Singulettten in einem Punktdiagramm von CD71 APC vs. CD235a FITC dar und trennen Sie die CD71+ Retikulozyten (Abbildung 6).

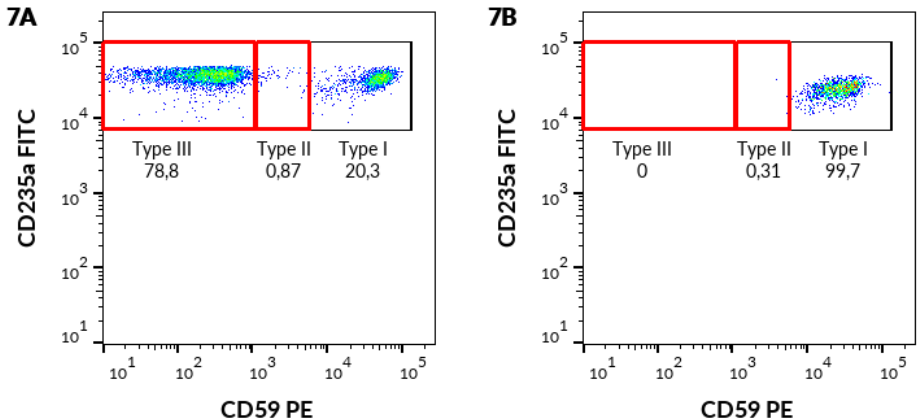
Abbildung 6 CD235a+ RBC-Singulettten in einem Punktdiagramm CD71 APC vs. CD235a FITC.

Abgrenzung von CD71+ Retikulozyten (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



Stellen Sie die D71+ Retikulozyten in einem Punktdiagramm von CD59 PE vs. CD235a FITC dar. Teilen Sie die Ereignisse mithilfe von drei geeigneten Gates in drei Populationen auf (Abbildung 7) und berechnen Sie den Prozentsatz der Ereignisse in den Regionen Typ I, Typ II und Typ III.

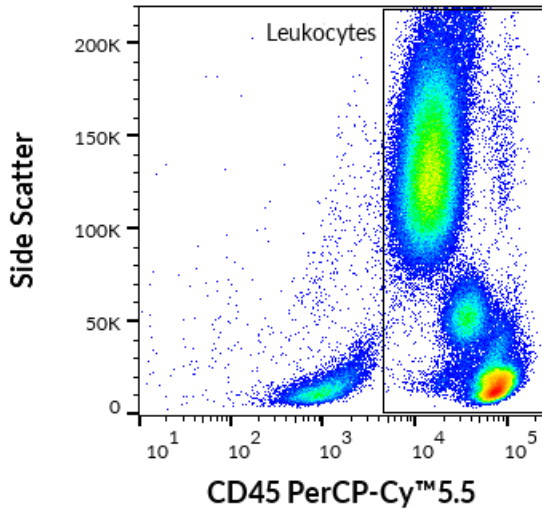
Abbildung 7 CD71+ Retikulozyten in einem Punktdiagramm CD59 PE vs. CD235a FITC (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



PNH WBC 7-color-Röhrchen (cyanfarbener Streifen)

Erfassen Sie mindestens 200.000 Ereignisse zur Analyse. Visualisieren Sie kompensierte Daten im S-Punktendiagramm mit Seitenstreuung im Vergleich zu Fluoreszenzintensität in PerCP-Cy™ 5.5. Setzen Sie das Gate für CD45+ Leukozyten wie in Abbildung 8 gezeigt ein.

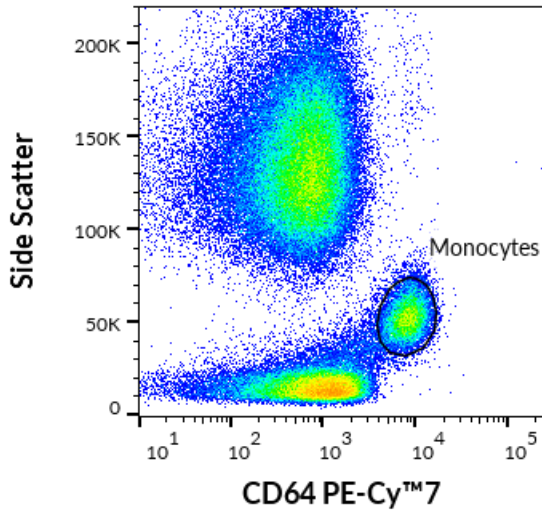
Abbildung 8 Abgrenzung von CD45+ Leukozyten (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



Monozyten

Stellen Sie die CD45⁺ Leukozyten in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung gegen CD64 PE-CyTM7 dar und grenzen Sie die CD64⁺ Monozyten ab, wie in Abbildung 9 gezeigt.

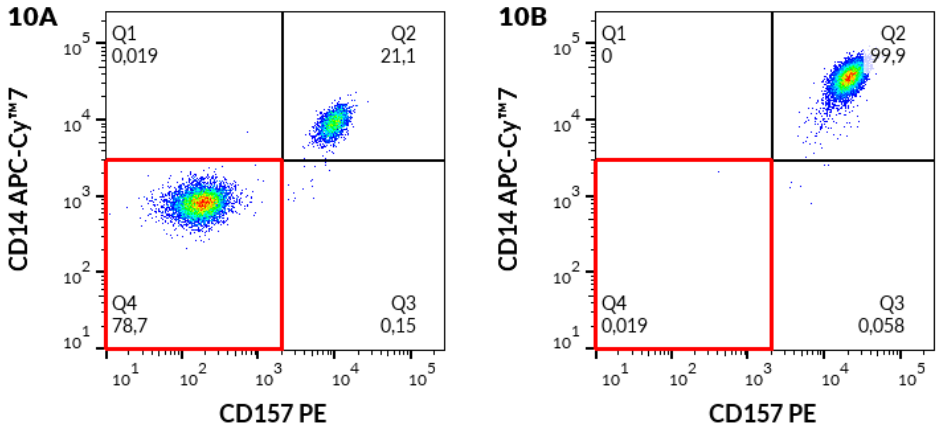
Abbildung 9 Abgrenzung von CD64⁺ Monozyten von Leukozyten (Daten, die mit BD FACSCantoTM II erfasst wurden).



Stellen Sie die CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm von CD157 PE vs. CD14 APC-Cy™7 (Abbildung 10) dar. Setzen Sie geeignete Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der CD157-CD14-Population im Q4-Quadranten.

Abbildung 10 CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm CD157 PE vs. CD14 APC-Cy™7 (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).

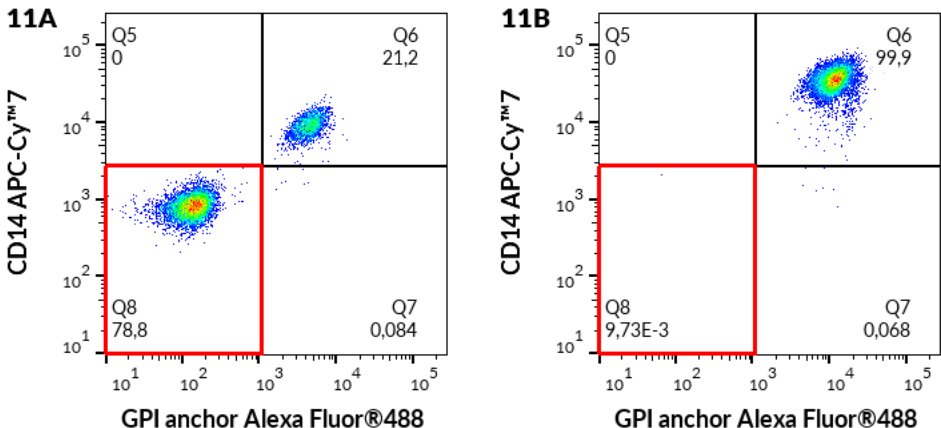
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Stellen Sie dann dieselben CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) im Vergleich zu CD14 APC- Cy™7 (Abbildung 11) dar. Setzen Sie geeignete Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker- CD14-Population im Q4-Quadranten.

Abbildung 11 CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) vs. CD14 APC Cy™7 (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).

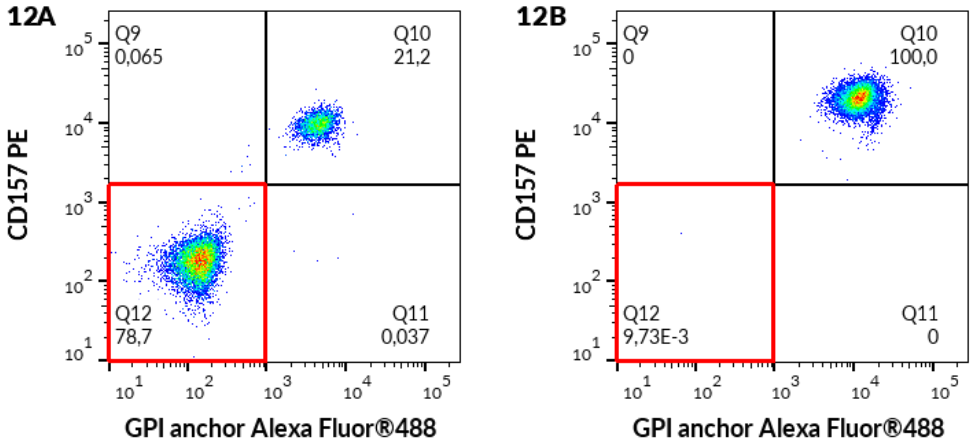
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Stellen Sie dann dieselben CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) im Vergleich zu CD157 PE (Abbildung 12) dar. Setzen Sie geeignete Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker- CD157-Population im Q4-Quadranten.

Abbildung 12 CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) vs. CD157 PE (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).

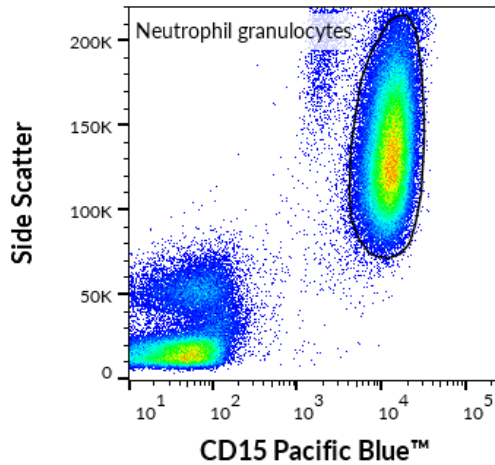
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Neutrophile Granulozyten

Stellen Sie die CD45+ Leukozyten in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung gegen CD15 Pacific Blue™ dar und grenzen Sie CD15+ neutrophile Granulozyten ab, wie in Abbildung 13 gezeigt.

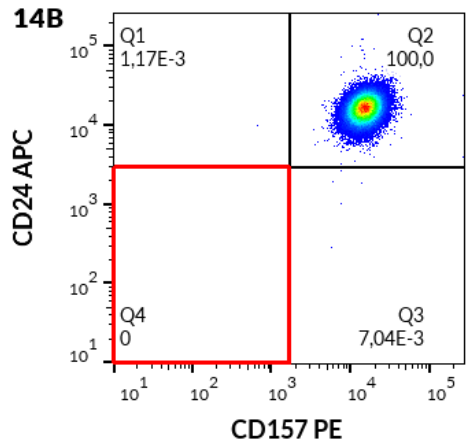
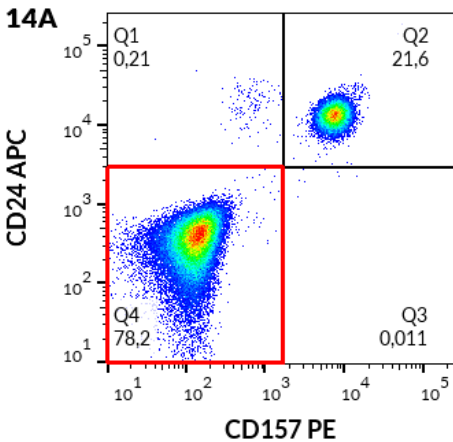
Abbildung 13 Abgrenzung von CD15+ neutrophilen Granulozyten von Leukozyten (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



Stellen Sie die CD15+ neutrophilen Granulozyten in einem Punktdiagramm von CD157 PE vs. CD24 APC dar, wie in Abbildung 14 gezeigt. Setzen Sie geeignete Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der CD157-CD24-Population im Q4-Quadranten.

Abbildung 14 CD15+ neutrophile Granulozyten in einem Punktdiagramm CD157 PE vs. CD24 APC (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).

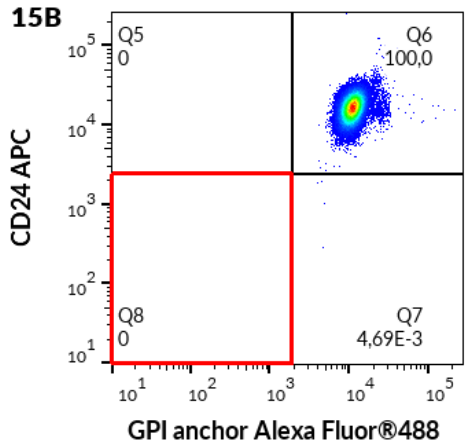
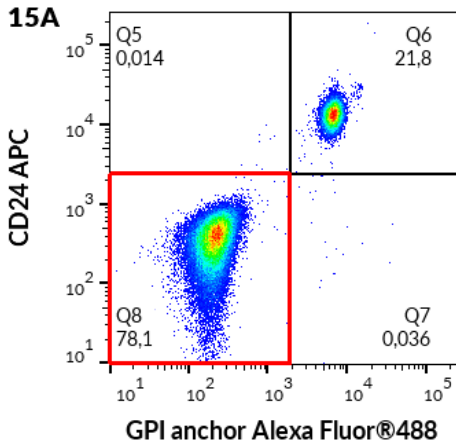
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Stellen Sie dann dieselben CD15+ neutrophilen Granulozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) gegen CD24 APC dar, setzen Sie entsprechende Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker- CD24-Population in Q4-Quadranten, wie in Abbildung 15 gezeigt.

Abbildung 15 CD15+ neutrophile Granulozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) vs. CD24 APC (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).

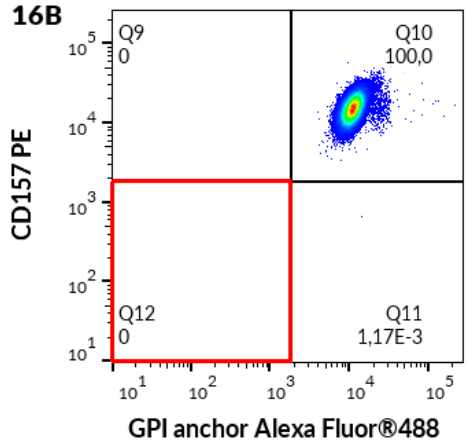
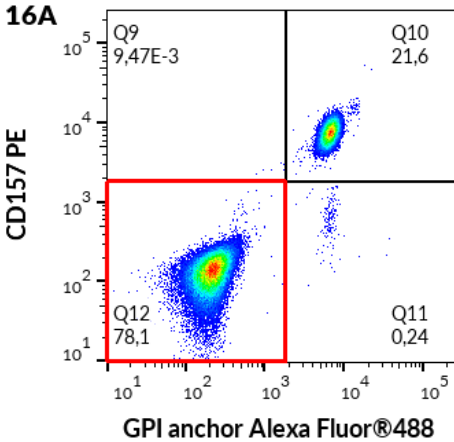
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Stellen Sie dann dieselben CD15+ neutrophilen Granulozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) gegen CD157 PE dar, setzen Sie entsprechende Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker-CD157-Population in Q4-Quadrant, wie in Abbildung 16 gezeigt.

Abbildung 16 CD15+ Neutrophile Granulozyten in einem Punktdiagramm Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI-Anker) vs. CD157 PE (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).

A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Berechnung und Interpretation von Analyseergebnissen

Zählen Sie den Prozentsatz der Zellen mit GPI-Mangel (mit PNH-Phänotyp) auf, siehe Tabelle 4.

Tabelle 4 PNH-Klon-Phänotypen

Population der Elternzellen		PNH-Phänotyp gemäß der Gating-Strategie
PNH RBC 3-color-Röhrchen	Erythrozyten (Typ III)	CD59- CD235a+ (Abb. 5)
	Erythrozyten (Typ II)	CD59 dim CD235a+ (Abb. 5)
	Retikulozyten (Typ III)	CD59- CD235a+CD71+ (Abb. 7)
	Retikulozyten (Typ II)	CD59 dim CD235a+CD71+ (Abb. 7)
PNH WBC 7-color-Röhrchen	Monozyten	CD14- CD157- CD64+ (Abb. 10)
		CD14- GPI-Anker- CD64+ (Abb. 11)
		CD157- GPI-Anker- CD64+ (Abb. 12)
	Neutrophile Granulozyten	CD24- CD157- CD15+ (Abb. 14)
		CD24- GPI-Anker- CD15+ (Abb. 15)
		CD157- GPI-Anker- CD15+ (Abb. 16)

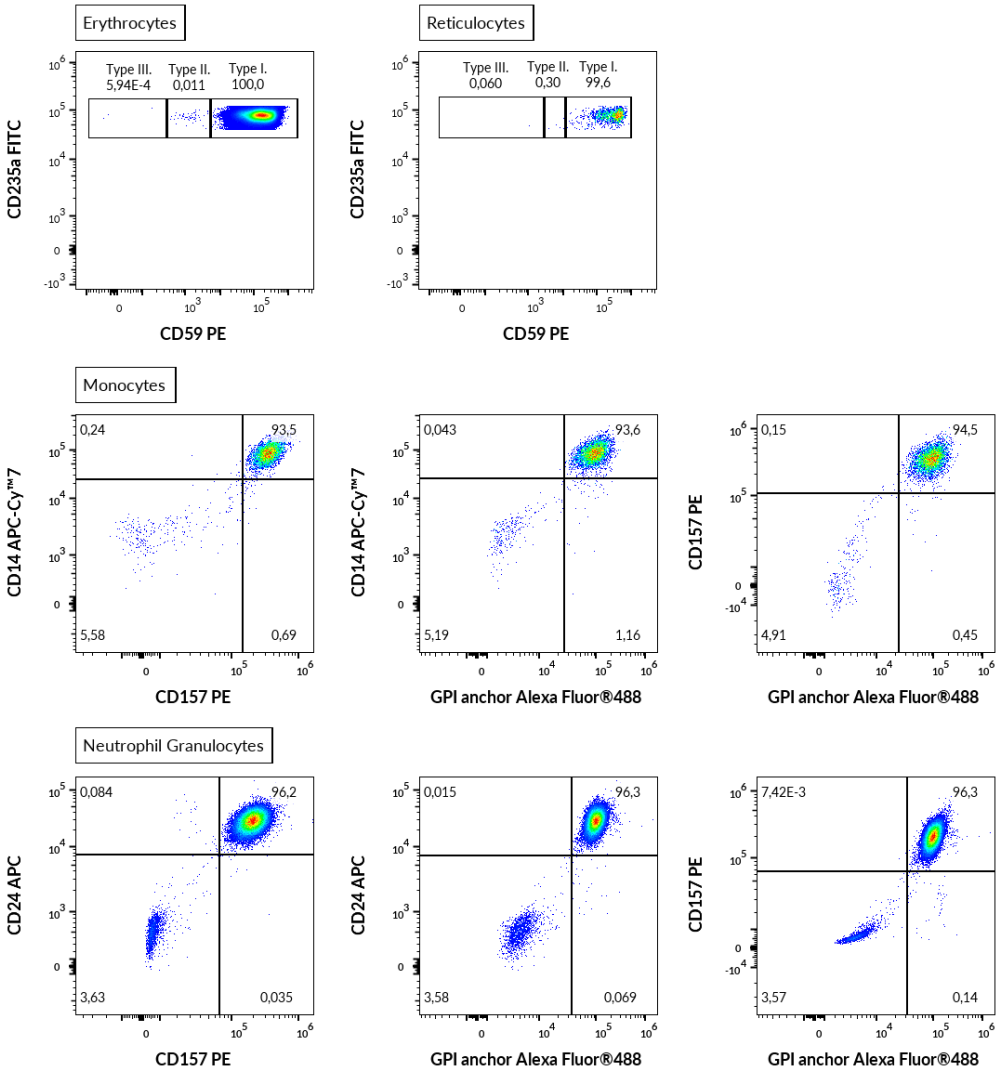
Tabelle 5 Ergebnisinterpretation

Nachweisgrenze (Cut-off) für die WBC- und RBC-Röhrchen, angegeben als Häufigkeit der Elternzellen (%), berechnet aus 100 Messungen von n=25 normalen Patientenproben auf n=4 verschiedenen Zytometerplattformen				
PNH-Phänotyp	Zytometer			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
PNH RBC 3-color-Röhrchen				
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	0.005	0.002	0.029	0.049
CD59- Retikulozyten vom Typ II und Typ III	0.240	0.320	0.388	0.562
PNH WBC 7-color-Röhrchen				
CD157- CD14- Monozyten	0.20	0.19	0.14	0.30
GPI-Anker- CD14- Monozyten	0.08	0.04	0.10	0.17
GPI-Anker- CD157- Monozyten	0.07	0.06	0.04	0.03
CD157- CD24- Neutrophile Granulozyten	0.02	0.02	0.06	0.03
GPI-Anker- CD24- Neutrophile Granulozyten	0.03	0.03	0.02	0.02
GPI-Anker- CD157- Neutrophile Granulozyten	0.01	0.01	0.01	0.01

Algorithmusregeln für die Meldung von GPI-Mängeln

1. Bei Patienten mit einer GPI-defizienten Zellpopulationshäufigkeit **unter** dem Cut-off-Wert (Tabelle 5) sind die Ergebnisse wie folgt zu melden:
„Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Retikulozyten zeigen eine normale Expression von GPI-gebundenen Antigenen. Keine PNH-Klone entdeckt“ ⁽¹⁾.
2. Bei Patienten mit einer GPI-defizienten Zellpopulationshäufigkeit **über** dem Cut-off-Wert (Tabelle 5) sind die Ergebnisse wie folgt zu melden:
„Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten oder Retikulozyten weisen einen teilweisen oder vollständigen GPI-Mangel auf.“ PNH-Klone entdeckt.
VORSICHT: Das klinische Labor muss seine eigenen Nachweisgrenzen (LOD)/Cut-off-Werte aus einer Reihe normaler Patientenproben ermitteln, wenn ein anderer Zytometertyp und/oder eine andere Zytometermarke, als in den Tabellen 7–10 angegeben, verwendet wird (siehe Abschnitt 11. Analytische Leistung / Nachweisgrenze / Assay Cut-off).
3. In den meisten PNH-Fällen weisen alle WBC-Zielzellpopulationen das Vorhandensein eines PNH-Klons auf ^(4, 6, 7, 8). WBC-PNH-Klone erscheinen geclustert und weniger verstreut als zufällige doppelt negative Ereignisse.
4. In einigen Fällen kann das Vorhandensein eines PNH-Klons im WBC-Röhrchen nachgewiesen werden, während dies in einem RBC-Röhrchen nicht nachgewiesen wird, wie in **Abb. 17** dargestellt. In diesem Fall muss das Vorhandensein eines PNH-Klons gemäß **Regel 2 der Algorithmusregel für die Meldung von GPI-Mängeln** gemeldet werden.
5. Wenn ein PNH-Klon entdeckt wird, geben Sie immer den Prozentsatz aller PNH-Klon-Phänotypen (Tabelle 5) aus ihrer Elternzellpopulation an. Monozyten können eine größere PNH-Klongröße aufweisen als neutrophile Granukulozyten ⁽²⁾.

Abbildung 17 Beispiel für einen Fall, bei dem ein PNH-Klon in einem WBC-Röhrchen vorhanden ist, während er in einem RBC-Röhrchen nicht nachgewiesen wird (Daten, die mit Beckman Coulter DxFLEx erfasst wurden).



11. Analytische Leistung

Spezifität

Proaerolysin Alexa Fluor® 488 ist eine fluoreszierend markierte Variante des bakteriellen Aerolysins, das sich spezifisch an GPI-Anker von Oberflächenmembranproteinen in menschlichen Zellen bindet ^(1, 2, 5, 8).

Der Antikörper SY11B5 erkennt ein extrazelluläres Epitop auf dem CD157-Antigen des hauptsächlich auf Monozyten und Granulozyten exprimierten CD157-Antigens. Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (Workshop HLDA X).

Der Antikörper 2D1 erkennt alle Leukozyten-Isoformen des menschlichen CD45 (Leukozyten-Common-Antigen). Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (Workshop HLDA III).

Der Antikörper 10.1 erkennt das humane CD64-Antigen, das auf Monozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (Workshop HLDA III: WS Code M-250).

Der Antikörper SN3 reagiert mit dem CD24-Antigen, das von Granulozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (HLDA IV: WS-Code B 136; HLDA V: WS-Code B CD24.7)

Der Antikörper MEM-15 reagiert mit CD14, einem GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-gebundenen Glykoprotein der extrazellulären Membran, das auf Monozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (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 Workshop).

Der Antikörper MEM-158 reagiert mit CD15, das stark auf der Oberfläche von Granulozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (HLDA VI: WS Code AS A053 Workshop).

Der Antikörper JC159 erkennt ein Epitop des extrazellulären Teils von CD235a (Glycophorin A), einem Sialoglykoprotein, das auf frühen Erythroblasten, späten Erythroblasten, Erythroblasten und reifen Erythrozyten exprimiert wird.

Der Antikörper MEM-43 reagiert mit einem genau definierten Epitop auf CD59 (Protectin), (GPI)-verankertem Glykoprotein, das auf der Oberfläche aller hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (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 Workshop).

Der Antikörper MEM-75 reagiert mit einem extrazellulären Epitop des CD71-Antigens, das auf unreifen Retikulozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (HLDA IV: WS-Code A 45; HLDA V: WS Code T T-165 Workshop).

Genauigkeit

Die Genauigkeit der Methode wurde durch einen Vergleich des DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kits mit der internen Methode eines anerkannten klinischen Labors durch parallele Färbung von 13 Patienten mit bestätigtem PNH-Phänotyp ermittelt. Die Parameter der linearen Regressionsanalyse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 Lineare Regressionsanalyse für die relative Anzahl von GPI-defizienten Zellpopulationen (PNH-Phänotypen) bei Patienten mit bestätigten PNH-Phänotypen (Vergleich des DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay-Kits mit einer anerkannten internen Methode eines klinischen Labors (ein Cocktail aus einfarbig konjugierten Antikörpern verschiedener Hersteller und analysiert mit BD FACSCanto™ II))

Lymphozyten-Untergruppe	n	Steigung	Schnittpunkt	R ²	Bereich [%]
CD59-CD235a+ Typ III Erythrozyten	13	0.99	-0.026	1.00	1.28 - 83.79
CD59-CD235a+ Typ III Retikulozyten	13	0.99	-0,384	1.00	5.97 - 97.78
CD59-CD235a+ Typ II Erythrozyten	13	1.00	-0,059	1.00	0.13 - 89.92
CD59-CD235a+ Typ II Retikulozyten	13	0.98	0.141	1.00	0.33 - 74.67
CD157- GPI-Anker- CD64+ Monozyten	13	1.00	0.060	1.00	2.07 - 99.95
CD157- GPI-Anker- CD15- Neutrophile	13	0.99	0.294	1.00	0.80 - 99.82
CD14- GPI-Anker- CD64+ Monozyten	13	Nicht bestimmt			2.04 - 99.96
CD14- CD157- CD64+ Monozyten	13	Nicht bestimmt			2.17 - 99.96
CD24- CD157- CD15+ Neutrophile	13	Nicht bestimmt			0.80 - 99.83
CD24- GPI-Anker- CD15- Neutrophile	13	Nicht bestimmt			0.81 - 99.80

Nachweisgrenze / Assay-Cut-off

Die Nachweisgrenze (LOD) wurde für jede Zielpopulation (siehe Tabelle 5) als Mittelwert der Ergebnisse von 25 gesunden Blutspendern, erhöht um drei Standardabweichungen vom Mittelwert, für 4 verschiedene Durchflusszytometerplattformen bestimmt und als Assay Cut-off in den Tabellen 7, 8, 9 und 10 angegeben.

VORSICHT: Das klinische Labor muss seine eigenen Nachweisgrenzen (LOD)/Cut-off-Werte aus einer Reihe normaler Patientenproben ermitteln, wenn ein anderer Zytometertyp und/oder eine andere Zytometermarke, als in den Tabellen 7-10 angegeben, verwendet wird.

Tabelle 7 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Cut-off-Werte für jeden PNH-Phänotyp zusammen mit PNH-Phänotyp-Inzidenz und LOQ, erfasst mit dem BD FACSLytic™ Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	BD FACSLytic™					
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	Cut-off (Mittelwert + 3*SD)	LOQ (Mittelwert + 10*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulett-RBC-Ereignisse)						
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0.003	0.001	5-48 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse (25 Ereignisse im Durchschnitt)	0.005 %	0.012 %
CD59- Retikulozyten vom Typ II und Typ III	25	0.054	0.061	0-5 Ereignisse pro 3.000 Retikulozyten (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.240 %	0.660 %
WBC-Röhrchen (200.000 erfasste Ereignisse)						
CD157- CD14-Monozyten	25	0.076	0.041	2-24 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (8 Ereignisse im Durchschnitt)	0.20 %	0.49 %
GPI-Anker- CD14-Monozyten	25	0.021	0.018	0-5 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.08 %	0.20 %
GPI-Anker- CD157-Monozyten	25	0.014	0.020	0-4 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (1 Ereignis im Durchschnitt)	0.07 %	0.21 %
CD157- CD24-Neutrophile Granulozyten	25	0.006	0.006	0-20 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (5 Ereignisse im Durchschnitt)	0.02 %	0.07 %
GPI-Anker- CD24-Neutrophile Granulozyten	25	0.006	0.008	0-29 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (6 Ereignisse im Durchschnitt)	0.03 %	0.09 %
GPI-Anker- CD157-Neutrophile Granulozyten	25	0.002	0.002	0-8 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.01 %	0.02 %

Tabelle 8 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Cut-off-Werte für jeden PNH-Phänotyp zusammen mit PNH-Phänotyp-Inzidenz und LOQ, erfasst mit dem BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	BD FACSCanto™ II					
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	Cut-off (Mittelwert + 3*SD)	LOQ (Mittelwert + 10*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulett-RBC-Ereignisse)						
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0.0006	0,0004	1–12 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse (6 Ereignisse im Durchschnitt)	0.002 %	0.004 %
CD59- Retikulozyten vom Typ II und Typ III	25	0.0657	0.0847	0–5 Ereignisse pro 1.000 Retikulozyten (1 Ereignis im Durchschnitt)	0.320 %	0.913 %
WBC-Röhrchen (200.000 erfasste Ereignisse)						
CD157- CD14-Monozyten	25	0.085	0.035	2–16 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (8 Ereignisse im Durchschnitt)	0.19 %	0.43 %
GPI-Anker- CD14-Monozyten	25	0.086	0.096	0–3 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (1 Ereignis im Durchschnitt)	0.04 %	0.10 %
GPI-Anker- CD157-Monozyten	25	0.084	0.019	0–7 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (1 Ereignis im Durchschnitt)	0.06 %	0.20 %
CD157- CD24-Neutrophile Granulozyten	25	0.004	0.052	0–17 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (5 Ereignisse im Durchschnitt)	0.02 %	0.06 %
GPI-Anker- CD24-Neutrophile Granulozyten	25	0.006	0.010	0–32 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (6 Ereignisse im Durchschnitt)	0.03 %	0.10 %
GPI-Anker- CD157-Neutrophile Granulozyten	25	0.002	0.002	0–8 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.01 %	0.02 %

Tabelle 9 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Cut-off-Werte für jeden PNH-Phänotyp zusammen mit PNH-Phänotyp-Inzidenz und LOQ, erfasst mit dem Beckman Coulter Navios EX Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	Beckman Coulter Navios EX					
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	Cut-off (Mittelwert + 3*SD)	LOQ (Mittelwert + 10*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulett-RBC-Ereignisse)						
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0.007	0.007	4–236 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse (60 Ereignisse im Durchschnitt)	0.029 %	0.081 %
CD59- Retikulozyten vom Typ II und Typ III	25	0.087	0.100	0–6 Ereignisse pro 1.000 Retikulozyten (1 Ereignis im Durchschnitt)	0.388 %	1.092 %
WBC-Röhrchen (200.000 erfasste Ereignisse)						
CD157- CD14- Monozyten	25	0.062	0.027	0–23 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (6 Ereignisse im Durchschnitt)	0.14 %	0.33 %
GPI-Anker- CD14- Monozyten	25	0.024	0.006	0–10 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.10 %	0.28 %
GPI-Anker- CD157- Monozyten	25	0.007	0.011	0–6 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (1 Ereignis im Durchschnitt)	0.04 %	0.12 %
CD157- CD24- Neutrophile Granulozyten	25	0.012	0.015	0–43 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (12 Ereignisse im Durchschnitt)	0.06 %	0.16 %
GPI-Anker- CD24- Neutrophile Granulozyten	25	0.005	0.005	0–13 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (5 Ereignisse im Durchschnitt)	0.02 %	0.05 %
GPI-Anker- CD157- Neutrophile Granulozyten	25	0.002	0.002	0–10 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.01 %	0.03 %

Tabelle 10 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Cut-off-Werte für jeden PNH-Phänotyp zusammen mit PNH-Phänotyp-Inzidenz und LOQ, erfasst mit dem Beckman Coulter DxFLEx Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	Beckman Coulter DxFLEx					
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	Cut-off (Mittelwert + 3*SD)	LOQ (Mittelwert + 10*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulett-RBC-Ereignisse)						
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0,015	0.012	5–48 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse (25 Ereignisse im Durchschnitt)	0.049 %	0.129 %
CD59- Retikulozyten vom Typ II und Typ III	25	0.106	0.152	0–5 Ereignisse pro 1.000 Retikulozyten (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.562 %	1.626 %
WBC-Röhrchen (200.000 erfasste Ereignisse)						
CD157- CD14- Monozyten	25	0.092	0.068	0–27 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (10 Ereignisse im Durchschnitt)	0.30 %	0.77 %
GPI-Anker- CD14- Monozyten	25	0.053	0.040	0–16 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (6 Ereignisse im Durchschnitt)	0.17 %	0.46 %
GPI-Anker- CD157- Monozyten	25	0.005	0.009	0–1 Ereignisse pro 10.000 Monozyten (1 Ereignis im Durchschnitt)	0.03 %	0.10 %
CD157- CD24- Neutrophile Granulozyten	25	0.010	0.008	0–28 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (10 Ereignisse im Durchschnitt)	0.03 %	0.09 %
GPI-Anker- CD24- Neutrophile Granulozyten	25	0.008	0.006	0–20 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (8 Ereignisse im Durchschnitt)	0.02 %	0.06 %
GPI-Anker- CD157- Neutrophile Granulozyten	25	0.002	0.002	0–5 Ereignisse pro 100.000 Neutrophile (2 Ereignisse im Durchschnitt)	0.01 %	0.02 %

12.Klinische Leistung

Patienten mit GPI-Mangel

Klinische Daten wurden an einem klinischen Standort von 19 Patienten gesammelt, sowohl von gesunden Patienten (6) als auch von Patienten mit bestätigtem GPI-Mangel (13). Die klinische Leistung wurde durch einen Vergleich des DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kits mit einer internen Methode eines anerkannten klinischen Labors ermittelt (ein Cocktail aus einfarbig konjugierten Antikörpern verschiedener Hersteller und analysiert mit BD FACSCanto™ II).

Der GPI-Mangel bei Patienten wurde im Hinblick auf die verwendete Methode (Tabelle 11) durch den Nachweis von GPI-defizienten Zellen (PNH-Klonen) bewertet.

Tabelle 11 Klinische Leistung des Produkts DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Beurteilung des GPI-Mangels mit der internen Methode eines akkreditierten klinischen Labors	
		GPI-Mangel	Normalzustand
Beurteilung des GPI-Mangels mit dem Gerät ED7750 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	GPI-Mangel	13 Patienten	0 Patienten
	Normalzustand	0 Patienten	6 Patienten

13. Erwartete Werte

Es wird erwartet, dass der Prozentsatz der GPI-defizienten Zellpopulationen (PNH-Phänotypen) bei normalen gesunden Patienten unter dem Cut-off-Wert für den jeweiligen PNH-Phänotyp liegt (Tabelle 5).

VORSICHT: Die mit dem DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit angezeigten Werte sind lediglich Richtwerte. Jedes Labor muss seine eigenen Werte für die Nachweisgrenze (Cut-off) anhand der lokalen Population normaler Spender festlegen.

14. Störende Substanzen und Einschränkungen

Es wurden keine störenden Substanzen identifiziert oder getestet.

Es wurden keine Einschränkungen für die Anwendung bei bestimmten Arten von Krankheiten, wie z. B. Anämien, festgestellt.

Die Meldung von GPI-Mängeln ist gemäß den aktuellen, veröffentlichten Leitlinien ⁽⁶⁾ begrenzt.

15. Referenzen

- 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.

16.Marken

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™ und BD Multitest™ sind eingetragene Marken von Becton, Dickinson and Company. Alexa Fluor®, Pacific Blue™ und Pacific Orange™ sind eingetragene Marken der Life Technologies Corporation. Cy™ und CyDye™ sind eingetragene Marken von Cytiva. SPHERO™ COMPtrol ist eine eingetragene Marke von Spherotech, Inc..

17.Revisionsverlauf

Version 1, ED7750_IFU_v1

Erste Veröffentlichung

18.Hersteller

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

Kontaktinformationen

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

19. Autorisierte Vertreter

Verantwortliche Person der Schweiz

EUMEDIQ AG
Grafenauweg 8
CH-6300 Zug
Switzerland
www.eumediq.eu

HINWEIS: Alle schwerwiegenden Vorfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde vor Ort zu melden.