

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit 25 essais | N° de réf. ED7750



Mode d'emploi (FR)

Version: ED7750_IFU_v2_FR

Date de publication: 25-10-2024

Symboles figurant sur l'étiquetage du produit

	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Marquage CE de conformité Numéro d'identification de l'organisme notifié		Garder au sec
	Fabricant		Avertissement
	Identifiant unique du dispositif		Ne pas réutiliser
	Consulter le mode d'emploi		Contient <n> tubes à essai à usage unique
	Contient suffisamment d'unités pour <n> tests		Solution concentrée (10x)
	Référence catalogue		Contenu
	Code du lot		Marque UKCA
	Date de péremption		
	Limite de température		

1. Usage prévu

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit est destiné à la détection et au dénombrement à haute sensibilité des cellules déficientes en glycosylphosphatidylinositol (GPI) dans le sang total humain par cytométrie en flux.

Éléments détectés et/ou mesurés

Le dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit détecte et dénombre les cellules déficientes en glycosylphosphatidylinositol (GPI) (clones HPN) en pourcentage des :

- Cellules CD59 dim ou CD59- de tous les érythrocytes (CD235a+)
- Cellules CD59 dim ou CD59- de tous les iRBCs (CD235a+CD71+)
- Cellules CD14-, CD157- et ancre GPI- de tous les monocytes (CD45+CD64+)
- Cellules CD24-, CD157- et ancre GPI- de tous les granulocytes neutrophiles (CD45+CD15+)

Fonction du dispositif

Le dispositif est destiné au diagnostic et au suivi des patients atteints ou qu'on soupçonne d'être atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) et de troubles apparentés ⁽¹⁾.

Contexte d'un état physiologique ou pathologique

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est un trouble rare des cellules souches hématopoïétiques résultant de l'expansion clonale non maligne de cellules présentant une mutation somatique du gène PIGA (Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class A). Les mutations du gène PIGA entraînent l'incapacité d'exprimer des protéines de surface cellulaire ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Le dispositif est destiné à détecter les granulocytes et monocytes neutrophiles déficients en GPI ⁽¹⁾, ainsi que les érythrocytes complets (type III) et partiels (type II) déficients en GPI ^(2,3,4,5,6) pour l'évaluation de la taille des clones HPN.

En outre, le dispositif détecte iRBCs déficients en GPI (érythrocytes immatures) chez les patients recevant des transfusions sanguines lorsque les érythrocytes HPN sont difficiles à délimiter ⁽⁷⁾.

Type de dosage

Non automatisé

Quantitatif

Type d'échantillon requis

Échantillon de sang total périphérique humain anticoagulé (EDTA, héparine, citrate)⁽¹⁾

Population testée

Patients présentant :

- des marqueurs de l'hémolyse en laboratoire, lorsque d'autres causes plus fréquentes d'hémolyse ont été exclues,
- des thromboses inexpliquées à un jeune âge,
- des thromboses diagnostiquées dans un site inhabituel,
- une anémie aplasique héréditaire ou acquise (AA),
- un syndrome myélodysplasique (SMD),
- une cytopénie inexpliquée chez qui les AA ou les SMD sont des considérations diagnostiques différentielles.⁽¹⁾

2. Utilisateur prévu

Le dispositif est destiné à un usage professionnel en laboratoire uniquement. Ne convient pas aux tests au chevet du patient ni aux auto-tests.

Conditions de qualification

Les utilisateurs prévus doivent avoir des compétences de pointe dans l'analyse de cytométrie en flux de cellules humaines, les techniques de laboratoire standard, notamment le pipetage, ainsi que la manipulation sûre et appropriée d'échantillons dérivés du corps humain.

L'utilisateur prévu doit respecter la norme EN ISO 15189 ou d'autres normes nationales, le cas échéant.

3. Principe du test

Le principe du test est basé sur la détection de l'ancre GPI et des protéines ancrées au GPI à la surface des cellules sanguines humaines. Les anticorps monoclonaux et la proaérolysine recombinante utilisés dans le test sont marqués avec différents fluorochromes qui sont excités par un faisceau laser provenant d'un cytomètre en flux lors de l'acquisition d'un échantillon de sang coloré. La fluorescence (émission de lumière) ultérieure de chaque fluorochrome présent sur une cellule sanguine acquise est recueillie et analysée par l'instrument. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la densité d'expression de l'antigène dans une cellule, permettant ainsi la séparation de différents sous-ensembles cellulaires.

4. Réactif(s) fourni(s)

Contenu

Le dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, suffisant pour l'examen de 25 patients, est fourni avec les réactifs suivants :

PNH High-Sensitivity Assay (25 sachets). Chaque sachet contient un tube à usage unique doté d'un capuchon à code couleur (bande cyan) **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) et un tube à usage unique doté d'un bouchon à code couleur (bande

rouge) **PNH RBC 3-color** (ED7750-2), contenant des combinaisons prémélangées de réactifs marqués au fluorochrome séchés avec les ingrédients stabilisants sous forme de couche au fond des tubes à essai (12 x 75 mm), voir les Tableaux 1 et 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 flacon) contenant 15 ml de solution tamponnée concentrée (10X) à base de formaldéhyde.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 sachet) contenant 10 tubes à usage unique bouchés, chacun contenant un seul réactif marqué au fluorochrome séché avec les ingrédients stabilisants en couche au fond du tube (12 x 75 mm).

MISE EN GARDE : PNH Compensation Set est uniquement destiné à la configuration de la compensation. Les réactifs marqués au fluorochrome (voir le Tableau 1 et le Tableau 2) permettent une procédure de compensation simple et précise.

Composition

Tableau 1 Description des principes actifs PNH WBC 7-color

Antigène	Fluorochrome	Clone	Isotype
Ancre GPI (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

Tableau 2 Description des principes actifs PNH RBC 3-color

Antigène	Fluorochrome	Clone	Isotype
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Matériel requis mais non fourni

Eau déionisée (qualité réactive)

Solution saline tamponnée au phosphate (1X PBS), pH 7,2 – 7,4

Particules de compensation de cytométrie en flux (Spherotech SPHERO™ COMPtrol Kit, réf. CMIgP-50-3K ou particules de compensation équivalentes)

6. Équipement requis

Pipette automatique avec embouts jetables (100 µl – 5 ml) pour le pipetage des échantillons et des réactifs

Distributeur de liquide ou pipette avec embouts jetables (2 ml) pour distribuer la solution de lyse des érythrocytes

Mélangeur vortex

Tubes à centrifuger coniques en polypropylène (15 ml ou 50 ml) pour la préparation des échantillons

Centrifugeuse avec adaptateurs de rotor appropriés pour tubes à fond rond de 12 x 75 mm

Cytomètre en flux avec trois sources d'excitation laser (488 nm, ~635 nm et 405 nm), des détecteurs de diffusion, des filtres optiques et des détecteurs d'émission appropriés pour recueillir les signaux émis par les fluorochromes indiqués dans le Tableau 3

Tableau 3 Caractéristiques spectrales des fluorochromes utilisés dans le dispositif

Fluorochrome	Excitation [nm]	Émission [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

REMARQUE : Le dispositif a été testé sur les cytomètres en flux BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter) et DxFLEx (Beckman Coulter).

7. Conservation et manipulation

Conservé à une température de 20-30 °C.

Éviter l'exposition prolongée à la lumière.

Garder au sec.

MISE EN GARDE : Produit sensible à l'humidité. Ne pas ouvrir le sachet en aluminium avant la première utilisation.

Voir la section 10 Procédure (Préparation des réactifs fournis) pour en savoir plus sur les conditions de stockage et la stabilité des solutions de travail (le cas échéant).

8. Avertissements, précautions et limitations d'utilisation

Classification des dangers SGH

AVERTISSEMENT : La solution de lyse (ED7750-3) contient du formaldéhyde (CAS n° 50-00-0) et du méthanol (CAS n° 67-56-1) à des concentrations classées comme dangereuses.

Éléments d'étiquetage	Mention d'avertissement
	Danger
	
Mentions de danger	<p>H315: Provoque une irritation cutanée. H317: Peut provoquer une allergie cutanée. H319: Provoque une sévère irritation des yeux. H335: Peut irriter les voies respiratoires. H341: Susceptible d'induire des anomalies génétiques. H350: Peut provoquer le cancer. H371: Risque présumé d'effets graves pour les organes. H373: May cause damage to the kidneys through prolonged or repeated exposure if swallowed. H302+H312+H332: Nocif en cas d'ingestion, de contact avec la peau ou d'inhalation.</p>
Mentions de précaution	<p>P201: Se procurer les instructions avant utilisation. P260: Ne pas respirer les vapeurs. P264: Se laver soigneusement les mains et les parties exposées du corps après manipulation. P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux. P301+P312: EN CAS D'INGESTION: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. P302+P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon. P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P308+P313: EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. P314: Consulter un médecin en cas de malaise. P333 + P313: En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.</p>

Consulter la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur la page du produit à l'adresse www.exbio.cz pour obtenir des informations complètes sur les risques qu'impliquent les substances chimiques et les mélanges contenus dans le produit, ainsi que sur la manière dont ils doivent être manipulés et éliminés.

Danger biologique

Les échantillons biologiques et les échantillons de sang humain ainsi que toute substance entrant en contact avec ces derniers sont toujours considérés comme du matériel infectieux.

Utiliser des équipements de sécurité et de protection individuelle pour éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses.

Respecter toutes les lois, réglementations et procédures en vigueur relatives à la manipulation et l'élimination du matériel infectieux.

Signes de détérioration

Le réactif fourni se présente normalement sous forme de couche séchée transparente au fond du tube. Ne pas utiliser le réactif si un changement d'aspect est observé, par exemple en cas de présence d'humidité à l'intérieur du tube.

Limitation d'utilisation

Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur les étiquettes des produits.

Ne pas réutiliser les tubes à essai.

9. Échantillon

Utiliser du sang périphérique veineux prélevé dans un récipient pour échantillon classé comme dispositif médical, avec la présence d'anticoagulants ETDA, héparine ou ACD (acide citrate dextrose) ⁽²⁾.

N'utiliser que des échantillons non traités. Ne pas utiliser d'échantillon déjà lysé, lavé ou dilué.

Traiter les échantillons de sang au plus tard 48 heures après leur prélèvement. Conservez l'échantillon à la température du laboratoire (20 °C - 25 °C). Ne pas réfrigérer l'échantillon.

Interférences endogènes

Les sources d'interférences endogènes sont identifiées dans le Tableau 4 sur la base des recherches littéraires scientifiques.

Tableau 4 Interférences endogènes du dispositif

Interférences endogènes	Impact	Référence
Albumine	À des concentrations élevées, l'albumine peut interférer en raison de sa capacité à se lier et à libérer de grandes quantités de ligands.	9, 10, 26
Bilirubine (ictère) (non conjuguée)	La bilirubine augmente le fond de fluorescence des cellules en raison de sa forte autofluorescence.	13, 15, 19
Débris cellulaires (après lyse)	Les débris cellulaires peuvent fausser la numération cellulaire et épuiser les anticorps présents dans le dispositif.	12, 16
Érythrocytes	Une lyse insuffisante des globules rouges présents dans l'échantillon peut fausser la numération cellulaire.	17
Hémoglobine	Les échantillons hémolysés peuvent produire des résultats peu fiables.	14
Anticorps humains anti-murins	Peuvent affecter la fonctionnalité du dispositif (capacité à se lier aux antigènes de surface cellulaire).	11, 21, 22, 23, 24, 25
Immunoglobulines	Peuvent affecter le nombre de sous-ensembles lymphocytaires.	12
Facteurs rhumatoïdes	La présence du facteur rhumatoïde interfère avec les tests immunologiques multiplex (MIA).	18
Triglycérides	Des niveaux élevés de lipides circulants peuvent affecter l'analyse par cytométrie en flux de certaines populations de cellules sanguines.	20

Interférences exogènes

Selon les articles publiés par Sutherland et al.⁽⁷⁾, les globules rouges provenant des transfusions sanguines constituent une interférence majeure dans l'analyse de l'HPN chez les patients présentant un clone d'HPN important et souffrant d'hémolyse extravasculaire. Les érythrocytes sains reçus par transfusion affectent de manière considérable le suivi du clone d'HPN dans la lignée des globules rouges (RBC). L'ajout de CD71 améliore considérablement la capacité d'analyse de la taille des clones d'HPN dans la lignée des globules rouges, indépendamment de l'état hémolytique et/ou transfusionnel du patient.

Le dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit résout ce problème conformément aux directives susmentionnées en proposant l'antigène CD71 pour

l'identification des globules rouges immatures (iRBC), où ces derniers expriment également l'antigène CD59 ancré à un GPI. Dans les poches de transfusion, les iRBC sont généralement représentés en très faible quantité ⁽²⁷⁾. D'autre part, les patients souffrant d'hémolyse extravasculaire causée par l'HPN présentent une augmentation du nombre d'iRBC en raison de la perte rapide d'érythrocytes ⁽²⁸⁾. En effet, l'ajout de l'anticorps monoclonal CD71 pour l'identification des iRBC permet au médecin de disposer d'un suivi plus précis de l'évolution de l'HPN, signalée par la perte de l'antigène CD59 sur les iRBC, ce qui lui permet de surmonter l'interférence des iRBC exogènes provenant des poches de transfusion. Le dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit contient un anticorps anti-CD71 humain et permet l'application des lignes directrices les plus récentes concernant la détection et la quantification des clones d'HPN.

10. Procédure

Préparation du ou des réactifs fournis

PNH High-Sensitivity Assay

Aucune préparation du réactif n'est nécessaire. Il est fourni dans des tubes à essai à usage unique.

Lysing Solution

Amener le réactif à température ambiante avant utilisation.

Le réactif est concentré à 10X et doit être dilué avec de l'eau désionisée avant utilisation (1 volume de la solution concentrée et 9 volumes d'eau déminéralisée). Après la première ouverture, le réactif conserve ses caractéristiques de performance jusqu'à la date de péremption, à condition qu'il soit conservé dans les conditions spécifiées dans son emballage primaire d'origine.

La solution de lyse diluée (1X) est stable pendant 1 mois lorsqu'elle est conservée dans un distributeur de liquide ou un récipient fermé à température ambiante.

Préparation du matériel requis, mais pas fourni

Particules de compensation

Préparer la solution de travail des particules de compensation de cytométrie en flux conformément aux instructions du fabricant.

Configuration de la compensation

Récupérer les tubes du kit de compensation en utilisant la même configuration de cytomètre en flux, avant l'analyse des tubes colorés PNH RBC 3-color et PNH WBC 7-color.

MISE EN GARDE : Les procédures de configuration de la compensation PNH RBC 3-color et PNH WBC 7-color diffèrent selon le type de préparation des échantillons et la coloration de l'échantillon.

Tubes de compensation PNH RBC 3-color (bande rouge)

1. Ajouter le SPHERO™ COMPtrol Kit ou des particules de compensation équivalentes au fond de chaque tube de compensation monochrome.
2. Agiter au vortex et laisser incuber pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
3. Ajouter 4 ml de PBS 1X dans chaque tube de compensation. Centrifuger pendant 5 minutes à 300×g.
4. Éliminer le surnageant sans perturber les particules de compensation et ajouter 0,1 ml de PBS 1X dans chaque tube de compensation.
5. Régler les tensions sur les détecteurs de fluorescence d'intérêt avant l'analyse des échantillons colorés. La tension sur un détecteur PMT doit être suffisamment élevée pour qu'un minimum d'événements colorés négativement interfèrent avec le canal 0 sur l'axe de fluorescence. En outre, la tension du détecteur PMT ne doit pas dépasser les valeurs auxquelles les événements positifs sont poussés vers l'axe droit.
6. Récupérer immédiatement les tubes de compensation colorés à l'aide du cytomètre en flux.
7. Calculer la matrice de compensation PNH RBC 3-color dans un logiciel de cytomètre développé par le fabricant ou dans un logiciel dédié à l'analyse des données de cytométrie hors ligne. Utiliser cette matrice de compensation pour tous les tubes à essai de ce lot de réactifs PNH RBC 3-color.

MISE EN GARDE : Une fois réglé pour le lot de réactifs PNH RBC 3-color spécifique, ne pas modifier les paramètres des détecteurs fluorescents afin de conserver les mêmes paramètres de récupération de la matrice de compensation et les mêmes résultats de compensation.

Tubes de compensation PNH WBC 7-color (bande cyan)

1. Ajouter 50 µl d'eau déionisée au fond de chaque tube de compensation monochrome et agiter vigoureusement au vortex pendant 7 à 10 secondes.
2. Ajouter 100 µl de sang total périphérique dans chaque tube de compensation monochrome et agiter vigoureusement au vortex.
3. Laisser incuber pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
4. Ajouter 2 ml de solution de lyse diluée (1X) dans chaque tube de compensation.
5. Laisser incuber pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

6. Centrifuger pendant 5 minutes à 300×g, éliminer le surnageant et remettre en suspension le culot cellulaire dans 2 ml de PBS 1X.
7. Centrifuger pendant 5 minutes à 300×g, éliminer le surnageant et remettre en suspension le culot cellulaire dans 0,2 ml de PBS 1X.
8. Régler les tensions sur les détecteurs de fluorescence d'intérêt avant l'analyse des échantillons colorés. La tension sur un détecteur PMT doit être suffisamment élevée pour qu'un minimum d'événements colorés négativement interfèrent avec le canal 0 sur l'axe de fluorescence. En outre, la tension du détecteur PMT ne doit pas dépasser les valeurs auxquelles les événements positifs sont poussés vers l'axe droit.
9. Récupérer immédiatement les tubes de compensation colorés à l'aide du cytomètre en flux.
10. Calculer la matrice de compensation PNH WBC 7-color dans un logiciel de cytomètre développé par le fabricant ou dans un logiciel dédié à l'analyse des données de cytométrie hors ligne. Utiliser cette matrice de compensation pour tous les tubes à essai de ce lot de réactifs PNH WBC 7-color.

MISE EN GARDE : Une fois réglé pour le lot de réactifs PNH WBC 7-color spécifique, ne pas modifier les paramètres des détecteurs fluorescents afin de conserver les mêmes paramètres de récupération de la matrice de compensation et les mêmes résultats de compensation.

Préparation des échantillons

La détection et la différenciation des clones HPN dans les érythrocytes à l'aide du tube PNH RBC 3-color nécessitent la préparation de l'échantillon avant la procédure de coloration.

REMARQUE : Avant de traiter l'échantillon, vérifier que le cytomètre a été correctement configuré.

1. Étiqueter un tube conique en polypropylène avec l'identifiant de l'échantillon de sang examiné.
2. Pipeter 10 µl d'échantillon de sang bien mélangé au fond du tube conique étiqueté.
3. Diluer l'échantillon de sang selon un rapport 1:100 avec 1 ml de PBS 1X et mélanger par oscillation à la main pendant 5 secondes.

MISE EN GARDE : La forme classique de l'HPN est dominée par l'hémolyse intravasculaire. Avant de diluer l'échantillon de sang, se reporter au dénombrement des globules rouges renvoyé par l'analyseur d'hématologie afin d'obtenir le nombre de globules rouges dans un échantillon de sang dilué compris

dans la plage de $3 \text{ à } 5 \times 10^7/\text{ml}$ de sang dilué et ajuster le facteur de dilution au besoin afin de récupérer un nombre suffisant des globules rouges dans un cytomètre en flux.

4. Passer à la procédure de coloration de l'échantillon immédiatement après la dilution de l'échantillon.

La détection de cellules déficientes en GPI dans les granulocytes et les monocytes neutrophiles à l'aide du tube PNH WBC 7-color ne nécessite aucune préparation de l'échantillon avant la procédure de coloration.

Coloration des échantillons – tube PNH RBC 3-color (bande rouge)

1. Étiqueter le tube PNH RBC 3-color avec l'identifiant de l'échantillon de sang examiné.
2. Pipeter 50 μl d'échantillon de sang dilué et bien mélangé au fond du tube PNH RBC 3-color.

MISE EN GARDE : Éviter de pipeter le sang sur le côté du tube à essai. S'il reste une trace ou une gouttelette de sang sur le côté du tube, il ne sera pas coloré par le réactif et il est possible que les résultats du dosage ne soient pas valides.

3. Agiter vigoureusement au vortex pendant 7 à 10 secondes.
MISE EN GARDE : Le raccourcissement du temps d'agitation au vortex peut affecter les résultats du test.
4. Laisser incuber le tube PNH RBC 3-color pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
5. Ajouter 4 ml de PBS 1X dans le tube PNH RBC 3-color.
6. Centrifuger le tube PNH RBC 3-color pendant 5 minutes à $300 \times g$.
7. Éliminer le surnageant sans déranger le culot cellulaire et ajouter 0,5 ml de PBS 1X dans le tube PNH RBC 3-color.
8. Agiter brièvement au vortex pour remettre en suspension le culot cellulaire.

Récupérer l'échantillon coloré à l'aide d'un cytomètre en flux. Si l'échantillon coloré n'est pas récupéré immédiatement, boucher le tube à essai, le conserver à $2-8^\circ\text{C}$ dans l'obscurité et l'analyser dans les 2 heures qui suivent.

MISE EN GARDE : Interrompre les agrégats de cellules dans l'échantillon coloré en faisant glisser le tube à essai contre le support de tubes immédiatement avant la récupération sur le cytomètre en flux. Une quantité excessive d'agrégats de globules rouges peut affecter les résultats du test.

Coloration des échantillons – tube PNH WBC 7-color (bande cyan)

1. Étiqueter le tube PNH WBC 7-color avec l'identifiant de l'échantillon de sang examiné.
2. Ajouter 50 µl d'eau déionisée dans le tube à essai PNH WBC 7-color. Agiter vigoureusement au vortex pendant 7 à 10 secondes.

MISE EN GARDE : Le raccourcissement du temps d'agitation au vortex peut affecter les résultats du test.

3. Pipeter 100 µl d'échantillon de sang bien mélangé au fond du tube PNH WBC 7-color et agiter vigoureusement au vortex.

MISE EN GARDE : Éviter de pipeter le sang sur le côté du tube à essai. S'il reste une trace ou une gouttelette de sang sur le côté du tube, il ne sera pas coloré par le réactif et il est possible que les résultats du dosage ne soient pas valides.

4. Laisser incuber pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
5. Ajouter 2 ml de solution de travail de lyse d'érythrocytes 1X dans le tube PNH WBC 7-color.
6. Laisser incuber pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
7. Centrifuger le tube PNH WBC 7-color pendant 5 minutes à 300×g.
8. Éliminer le surnageant sans déranger le culot cellulaire et ajouter 2 ml de PBS 1X dans le tube à essai.
9. Centrifuger le tube PNH WBC 7-color pendant 5 minutes à 300×g.
10. Éliminer le surnageant sans déranger le culot cellulaire et ajouter 0,2 ml de PBS 1X dans le tube à essai.
11. Agiter brièvement au vortex pour remettre en suspension le culot cellulaire.

Récupérer l'échantillon coloré à l'aide d'un cytomètre en flux. Si l'échantillon coloré n'est pas récupéré immédiatement, boucher le tube à essai, le conserver à 2-8 °C dans l'obscurité et l'analyser dans un délai de 24 heures.

Analyse par cytométrie en flux

Le cytomètre en flux sélectionné pour être utilisé avec le dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit doit être calibré de façon routinière à l'aide de microbilles fluorescentes pour garantir la stabilité de la sensibilité des détecteurs conformément aux instructions du fabricant du cytomètre.

S'il n'est pas correctement entretenu, le cytomètre en flux peut produire de faux résultats.

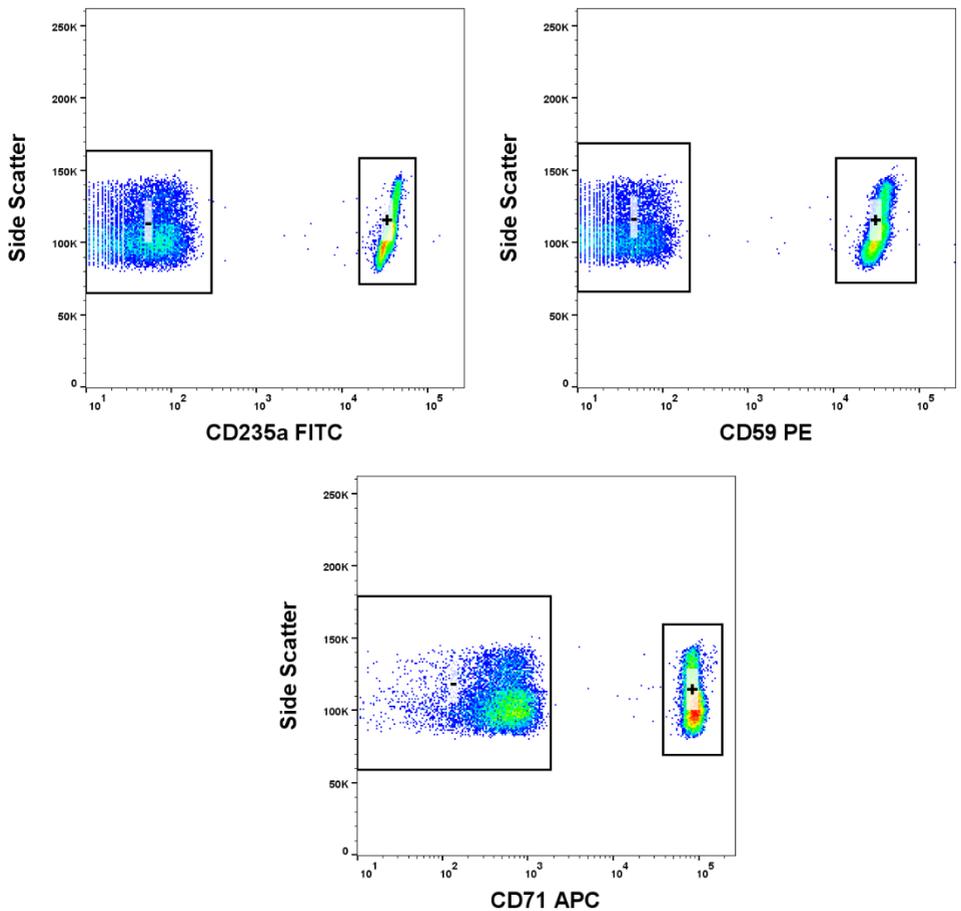
Se reporter aux spécifications du cytomètre indiquées par le fabricant concernant les lasers et les détecteurs de fluorescence selon les caractéristiques d'excitation et d'émission des fluorochromes à la section 6 Équipement requis.

Pour l'analyse des données mesurées, il est possible d'utiliser un logiciel de cytométrie développé par le fabricant ou un logiciel dédié à l'analyse des données de cytométrie hors ligne (par exemple FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analyse des tubes de compensation PNH RBC 3-color (bande rouge)

Visualiser les données non compensées pour chaque tube de compensation dans un diagramme à diffusion latérale (DDL) par rapport au graphique par points « fluorochrome à compenser ». Régler les seuils pour les particules de compensation de cytométrie positives (+) et négatives (-) comme indiqué dans la Figure 1.

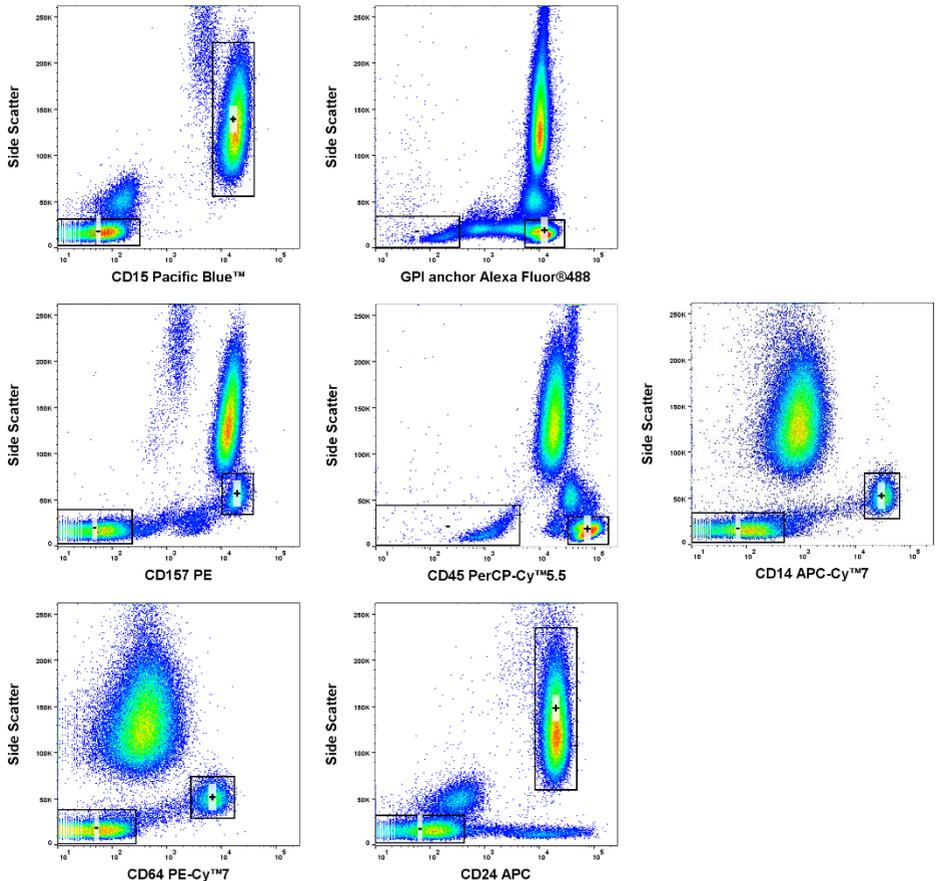
Figure 1 Identification des particules de compensation de cytométrie positives (+) et négatives (-) dans les tubes de compensation (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



Analyse des tubes de compensation PNH WBC 7-color (bande cyan)

Visualiser les données non compensées pour chaque tube de compensation dans un diagramme à diffusion latérale (DDL) par rapport au graphique par points « fluorochrome à compenser ». Régler les seuils pour les populations les plus positives (+) et les plus négatives (-) comme indiqué dans la Figure 2.

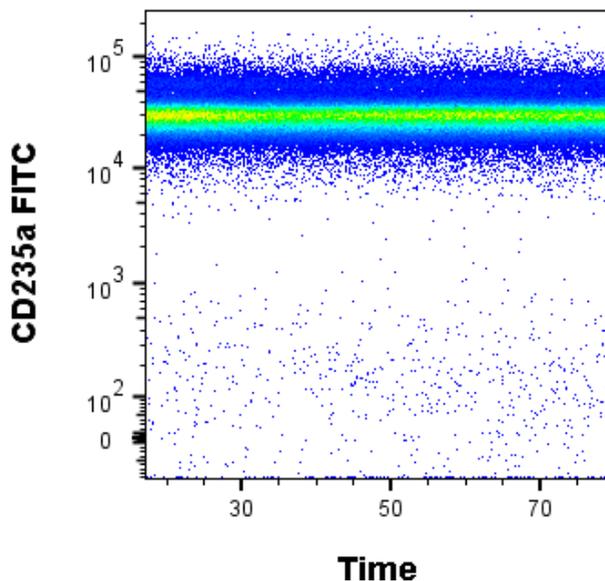
Figure 2 Identification des événements les plus positifs (+) et les plus négatifs (-) dans les tubes de compensation (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



Tube PNH RBC 3-color (bande rouge)

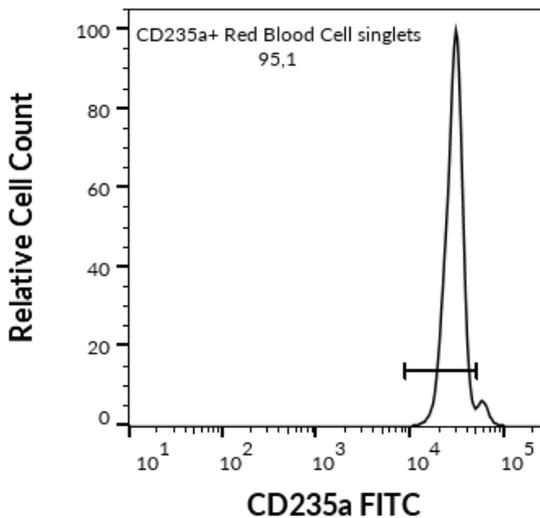
En raison du faible nombre de iRBCs dans l'échantillon de sang dilué, récupérer 500 000 à 1 500 000 événements érythrocytaires pour analyse. La récupération de $\geq 500\,000$ événements entraîne des délais de récupération prolongés. Cela peut affecter l'équilibre du complexe de liaison anticorps-antigène et la diminution de la fluorescence CD235a FITC. Toujours surveiller la stabilité de l'intensité de la fluorescence pendant le temps de récupération (Figure 3).

Figure 3 Tous les événements récupérés dans un graphique par points CD235a FITC versus Temps (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



Visualiser les données compensées sous forme d'histogrammes où l'axe horizontal représente l'intensité de la fluorescence dans le canal FITC. Régler le seuil des « singlets GR CD235a+ » (Figure 4).

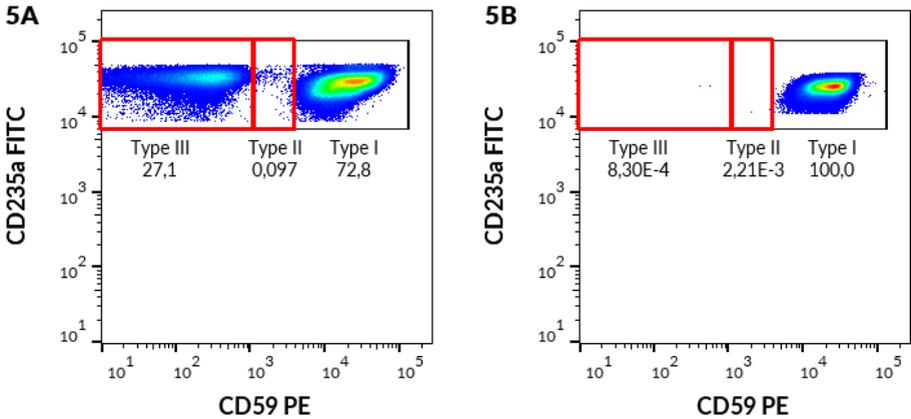
Figure 4 Délimitation des singlets GR CD235a+ (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



Érythrocytes

Visualiser les singulets GR CD235a+ dans un graphique par points CD59 PE versus CD235a FITC. Séparer les événements en trois populations en utilisant trois seuils appropriés (Figure 5) et calculer le pourcentage d'événements dans les régions de Type I, Type II et Type III.

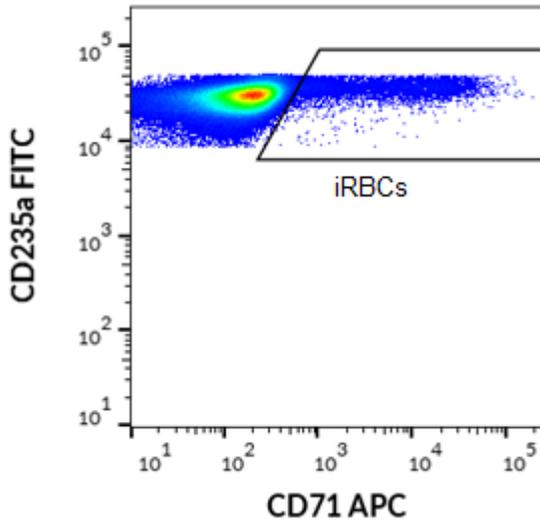
Figure 5 Singulets GR CD235a+ dans un graphique par points CD59 PE versus CD235a FITC (données acquises sur BD FACSCanto™ II).
A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



iRBCs (érythrocytes immatures)

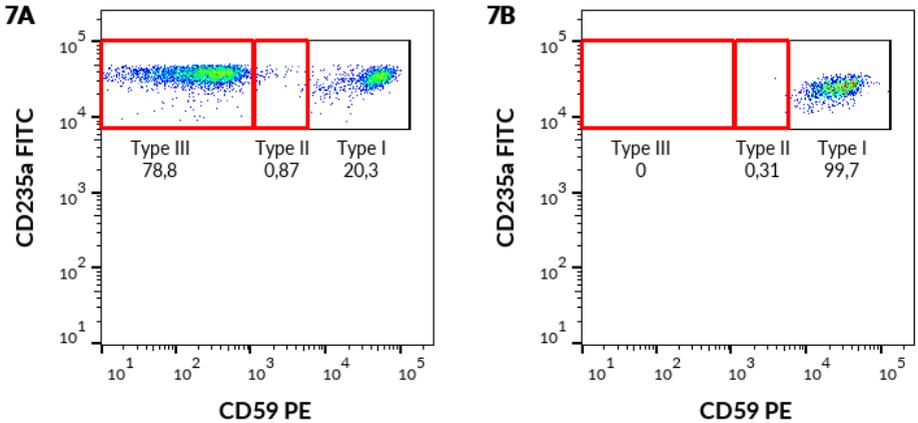
Visualiser les singulets GR CD235a+ dans un graphique par points CD71 APC versus CD235a FITC et séparer les iRBCs CD71+ (Figure 6).

Figure 6 Singulets GR CD235a+ dans un graphique par points CD71 APC versus CD235a FITC. Délimitation des iRBCs CD71+ (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



Visualiser les iRBCs CD71+ dans un graphique par points CD59 PE versus CD235a FITC. Séparer les événements en trois populations en utilisant trois seuils appropriés (Figure 7) et calculer le pourcentage d'événements dans les régions de Type I, Type II et Type III.

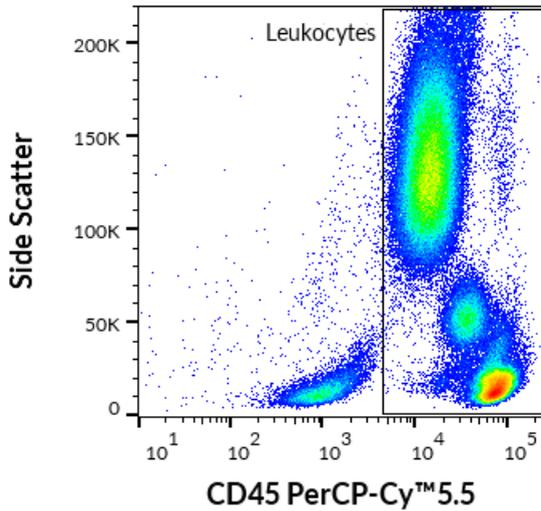
Figure 7 iRBCs CD71+ dans un graphique par points CD59 PE versus CD235a FITC (données acquises sur BD FACSCanto™ II).
A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



Tube PNH WBC 7-color (bande cyan)

Récupérer au moins 200 000 événements pour analyse. Visualiser les données compensées dans un diagramme à diffusion latérale par points par rapport à l'intensité de la fluorescence dans PerCP-Cy™ 5.5. Régler le seuil de leucocytes CD45+ comme indiqué dans la Figure 8.

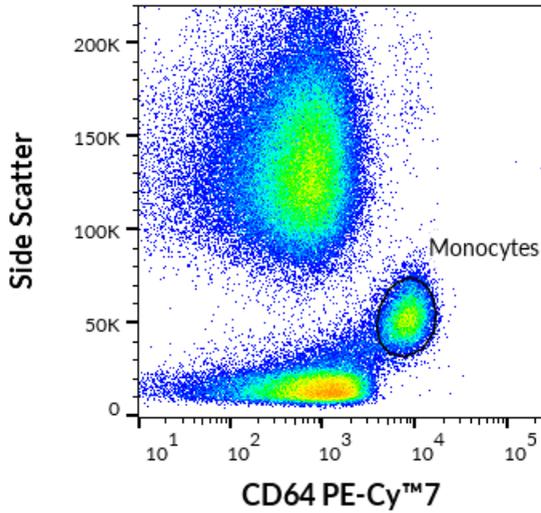
Figure 8 Délimitation des leucocytes CD45+ (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



Monocytes

Visualiser les leucocytes CD45+ dans un diagramme à diffusion latérale par points versus CD64 PE-Cy™7 et délimiter les monocytes CD64+ comme illustré dans la Figure 9.

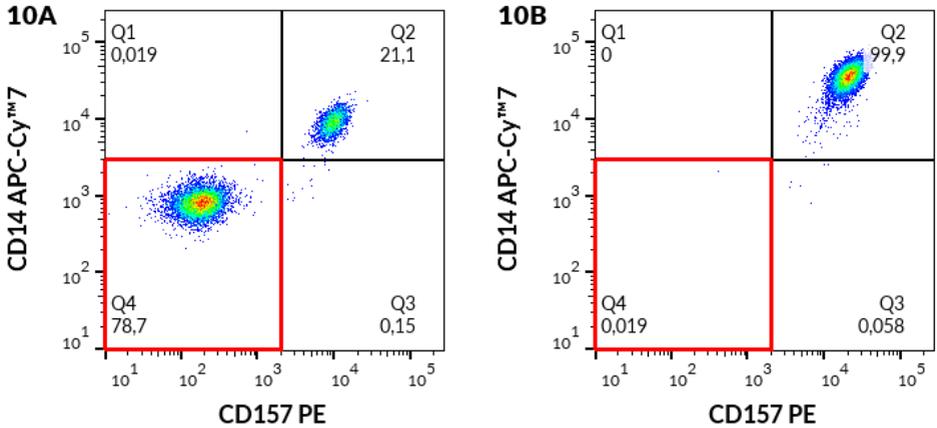
Figure 9 Délimitation des monocytes CD64+ des leucocytes (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



Visualiser les monocytes CD64+ dans un graphique par points CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (Figure 10). Définir les seuils appropriés et calculer le pourcentage de population CD157-CD14- dans le quadrant Q4.

Figure 10 Monocytes CD64+ dans un graphique par points CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (données acquises sur BD FACSCanto™ II).

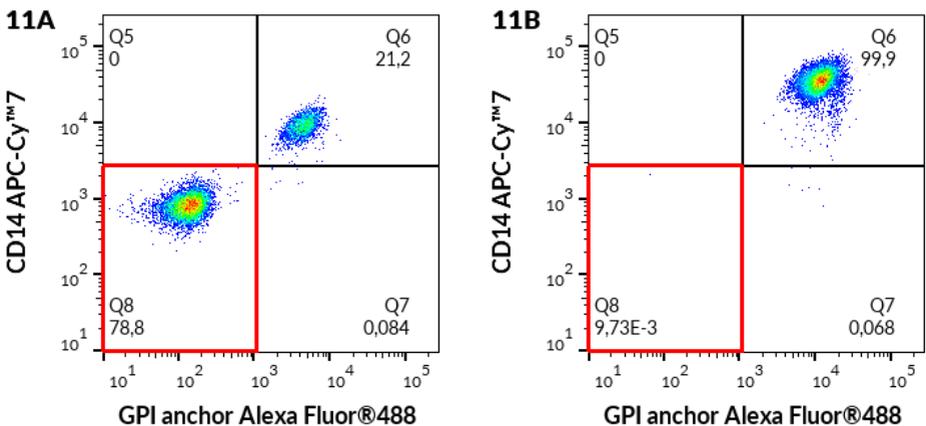
A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



Visualiser ensuite les mêmes monocytes CD64+ dans un graphique par points Proaérolysine Alexa Fluor® 488 (ancre GPI) versus CD14 APC-Cy™7 (Figure 11). Définir les seuils appropriés et calculer le pourcentage de population d'ancre GPI-CD14- dans le quadrant Q4.

Figure 11 Monocytes CD64+ dans un graphique par points Proaérolysine Alexa Fluor® 488 (ancre GPI) versus CD14 APC Cy™7 (données acquises sur BD FACSCanto™ II).

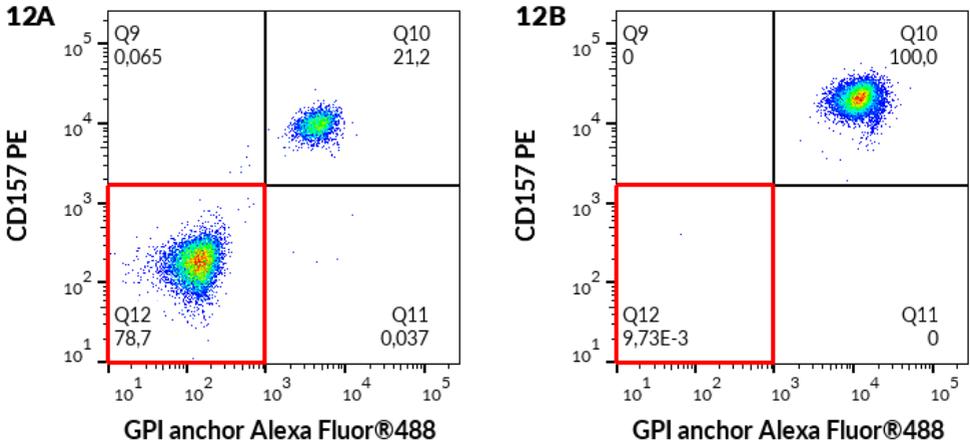
A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



Visualiser ensuite les mêmes monocytes CD64+ dans un graphique par points Proaérolysine Alexa Fluor® 488 (ancre GPI) versus CD157 PE (Figure 12). Définir les seuils appropriés et calculer le pourcentage de population d'ancr GPI- CD157- dans le quadrant Q4.

Figure 12 Monocytes CD64+ dans un graphique par points Proaérolysine Alexa Fluor® 488 (ancr GPI) versus CD157 PE (données acquises sur BD FACSCanto™ II).

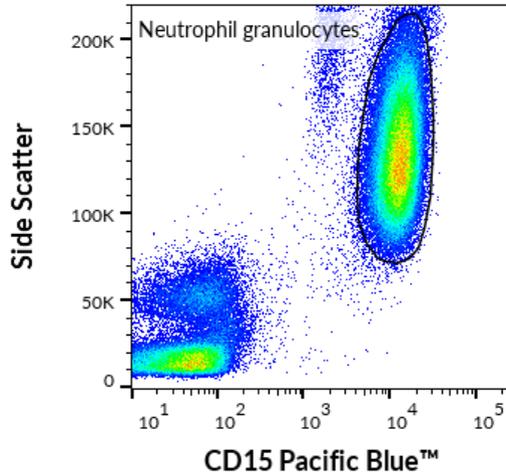
A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



Granulocytes neutrophiles

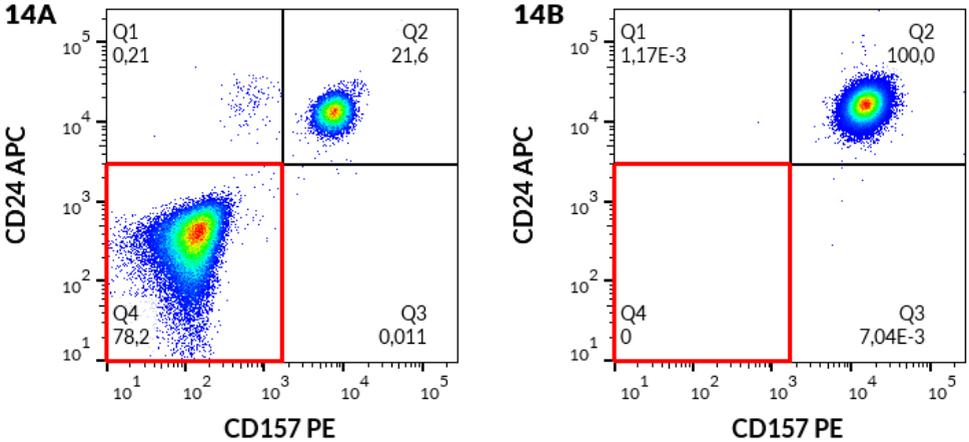
Visualiser les leucocytes CD45+ dans un diagramme à dispersion latérale par points versus le CD15 Pacific Blue™ et séparer les granulocytes neutrophiles CD15+, comme illustré dans la Figure 13.

Figure 13 Délimitation des granulocytes neutrophiles CD15+ des leucocytes (données acquises sur BD FACSCanto™ II).



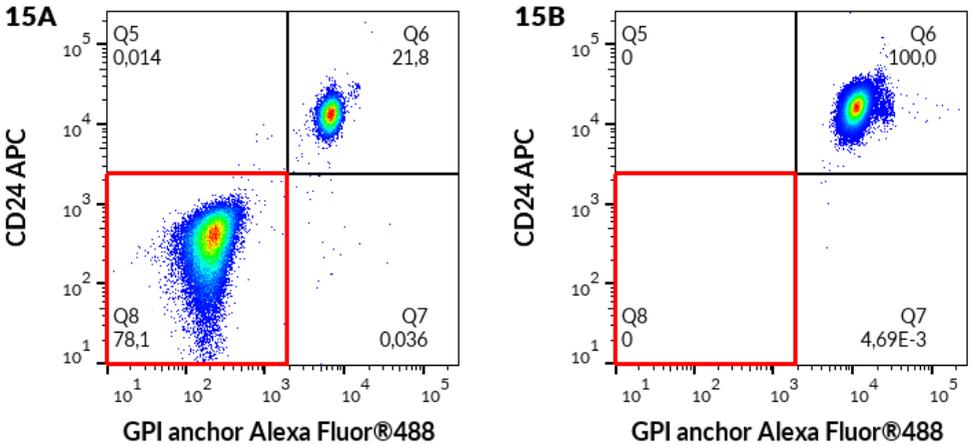
Visualiser les granulocytes neutrophiles CD15+ dans un graphique par points CD157 PE versus CD24 APC, comme illustré dans la Figure 14. Définir les seuils appropriés et calculer le pourcentage de population CD157- CD24- dans le quadrant Q4.

Figure 14 Granulocytes neutrophiles CD15+ dans un graphique par points CD157 PE versus CD24 APC (données acquises sur BD FACSCanto™ II).
A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



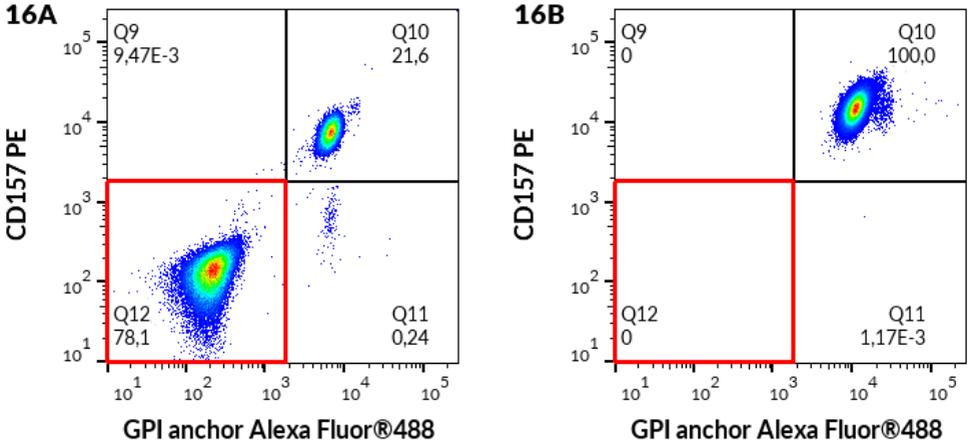
Visualiser ensuite les mêmes granulocytes neutrophiles CD15+ dans un graphique par points Proaérolyisine Alexa Fluor® 488 (ancre GPI) versus CD24 APC, définir les seuils appropriés et calculer le pourcentage de population d'ancre GPI- CD24- dans le quadrant Q4, comme illustré dans la Figure 15.

Figure 15 Granulocytes neutrophiles CD15+ dans un graphique par points Proaérolyisine Alexa Fluor® 488 (ancre GPI) versus CD24 APC (données acquises sur BD FACSCanto™ II).
A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



Visualiser ensuite les mêmes granulocytes neutrophiles CD15+ dans un graphique par points Proaérolyisine Alexa Fluor® 488 (ancre GPI) versus CD157 PE, définir les seuils appropriés et calculer le pourcentage de population d'ancre GPI- CD157- dans le quadrant Q4, comme illustré dans la Figure 16.

Figure 16 Granulocytes neutrophiles CD15+ dans un graphique par points Proaérolyisine Alexa Fluor® 488 (ancre GPI) versus CD157 PE (données acquises sur BD FACSCanto™ II).
 A) Patient avec un clone HPN ; B) Donneur sain



Calcul et interprétation des résultats de l'analyse

Énumérer le pourcentage de cellules déficientes en GPI (ayant un phénotype HPN), voir le Tableau 5.

Tableau 5 Phénotypes des clones HPN

Population de cellules mères		Phénotype HPN selon la stratégie de contrôle
Tube PNH RBC 3-color	Érythrocytes (Type III)	CD59- CD235a+ (Fig. 5)
	Érythrocytes (Type II)	CD59 dim CD235a+ (Fig. 5)
	iRBCs (Type III)	CD59- CD235a+CD71+ (Fig. 7)
	iRBCs (Type II)	CD59 dim CD235a+CD71+ (Fig. 7)
Tube PNH WBC 7-color	Monocytes	CD14- CD157- CD64+ (Fig. 10)
		Ancre GPI- CD14- CD64+ (Fig. 11)
		Ancre GPI- CD157- CD64+ (Fig. 12)
	Granulocytes neutrophiles	CD24- CD157- CD15+ (Fig. 14)
		Ancre GPI- CD24- CD15+ (Fig. 15)
		Ancre GPI- CD157- CD15+ (Fig. 16)

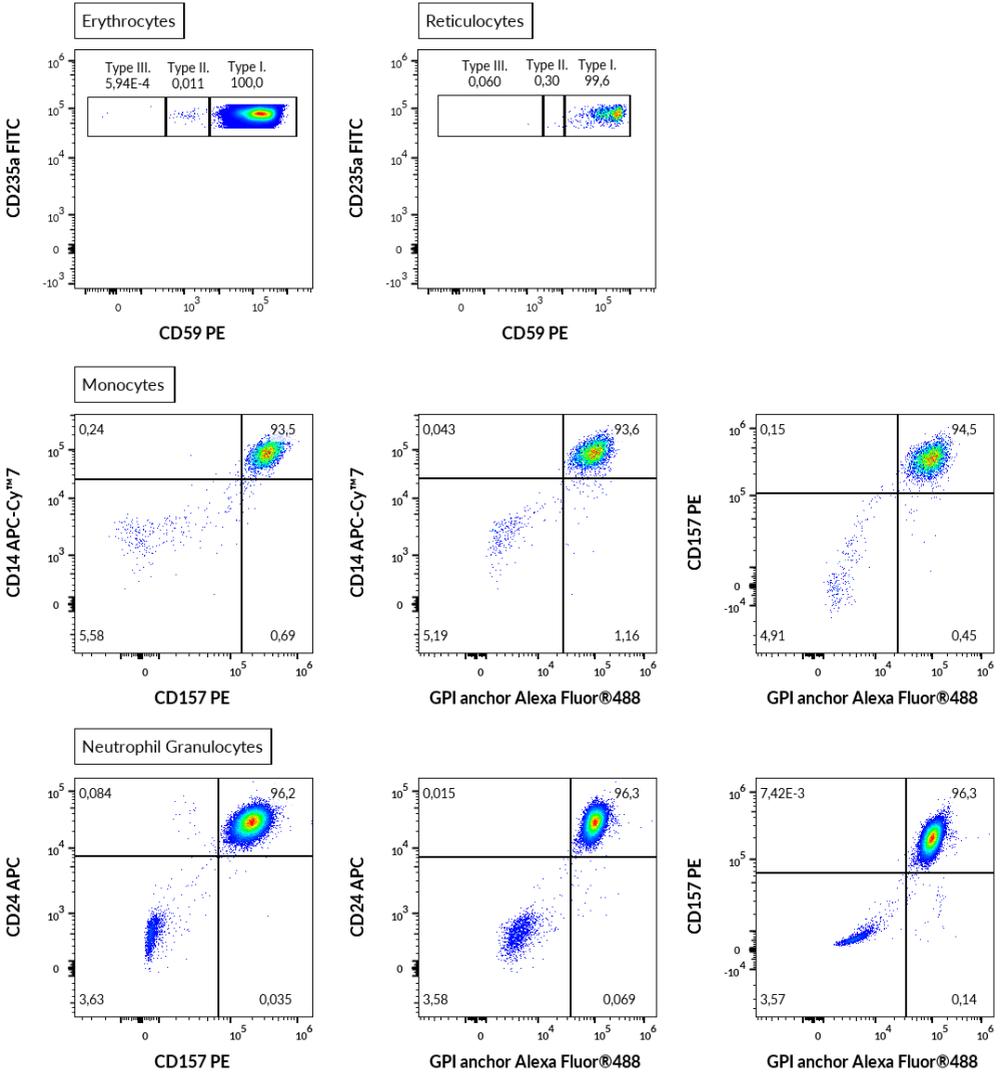
Tableau 6 Interprétation des résultats

Limite de détection (seuil) pour les tubes de globules blancs et de globules rouges signalée comme fréquence des cellules mères (%), calculée à partir de 100 mesures de n=25 échantillons de patients normaux sur n=4 plateformes de cytomètre différentes				
Phénotype HPN	Cytomètre			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
Tube PNH RBC 3-color				
Globules rouges CD59- de Type II et Type III	0.005	0.002	0.029	0.049
iRBCs CD59- de Type II et Type III	0.240	0.320	0.388	0.562
Tube PNH WBC 7-color				
Monocytes CD157- CD14-	0.20	0.19	0.14	0.30
Monocytes ancre GPI- CD14-	0.08	0.04	0.10	0.17
Monocytes ancre GPI- CD157-	0.07	0.06	0.04	0.03
CD157- CD24- Granulocytes neutrophiles	0.02	0.02	0.06	0.03
Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD24-	0.03	0.03	0.02	0.02
Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD157-	0.01	0.01	0.01	0.01

Règles de l'algorithme de signalement de déficit en GPI

1. Chez les patients dont la fréquence de population cellulaire déficiente en GPI est **inférieure** à la valeur de seuil (Tableau 6), les résultats doivent être rapportés comme suit : « **Les granulocytes, monocytes, globules rouges et iRBCs présentent une expression normale des antigènes liés au GPI. Aucun clone HPN détecté.** »⁽¹⁾.
2. Chez les patients dont la fréquence de population cellulaire déficiente en GPI est **supérieure** à la valeur de seuil (Tableau 6), les résultats doivent être rapportés comme suit : « **Les granulocytes, monocytes, globules rouges ou iRBCs présentent un déficit partiel ou total en GPI.** » **Clones HPN détectés.**
MISE EN GARDE : Le laboratoire clinique doit établir sa propre limite de détection (LDD)/ses propres valeurs de seuil à partir d'un ensemble d'échantillons de patients normaux lorsqu'il utilise un type et/ou une marque de cytomètre différents de ceux spécifiés dans les Tableaux 8 à 11 (voir la section 11. Performances d'analyse/Limite de détection/Seuil du dosage).
3. Dans la plupart des cas d'HPN, toutes les populations de cellules cibles GB montrent la présence d'un clone HPN^(4, 6, 7, 8). Les clones HPN GB apparaissent regroupés et moins dispersés que les événements doubles négatifs aléatoires.
4. Dans certains cas, la présence d'un clone HPN peut être détectée dans un tube GB, alors qu'elle n'est pas détectée dans un tube GR, comme le montre la **Fig. 17**. Dans ce cas, la présence d'un clone HPN doit être signalée conformément à la **règle 2 de l'algorithme de signalement des déficits en GPI**.
5. Si un clone HPN est détecté, il faut toujours signaler le pourcentage de tous les phénotypes de clones HPN (Tableau 6) de leur population de cellules mères. Les monocytes peuvent présenter une plus grande taille de clone HPN que les granulocytes neutrophiles⁽²⁾.
6. La carence en GPI (présence d'un clone d'HPN) devrait s'exprimer dans tous les phénotypes d'HPN au sein d'un sous-ensemble donné de leucocytes. Tous les phénotypes HPN monocytaires (tableau 5) devraient colorer de la même manière les cellules déficientes en GPI⁽⁶⁾. Il en va de même pour les phénotypes neutrophiles HPN.

Figure 17 Exemple d'un cas avec présence de clone HPN dans un tube GB, alors qu'il n'est pas détecté dans un tube GR (données acquises sur Beckman Coulter DxFLEx).



11. Performances analytiques

Specificity

La proaérolysine Alexa Fluor® 488 est une variante de l'aérolysine bactérienne marquée par fluorescence qui se lie spécifiquement aux ancres GPI des protéines membranaires de surface dans les cellules humaines ^(1, 2, 5, 8).

L'anticorps SY11B5 reconnaît un épitope extracellulaire sur l'antigène CD157 de l'antigène CD157 exprimé principalement sur les monocytes et les granulocytes. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'HCDM Council (atelier HLDA X).

L'anticorps 2D1 reconnaît toutes les isoformes leucocytaires du CD45 humain (antigène commun leucocytaire). La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'HCDM Council (atelier HLDA III).

L'anticorps 10.1 reconnaît l'antigène CD64 humain, qui est exprimé sur les monocytes. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par les ateliers HLDA (atelier HLDA III : WS Code M-250).

L'anticorps SN3 réagit avec l'antigène CD24, exprimé par les granulocytes. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'atelier HLDA (ateliers HLDA IV : WS Code B 136 ; HLDA V : WS Code B CD24.7)

L'anticorps MEM-15 réagit avec CD14, une glycoprotéine membranaire extracellulaire liée au GPI (glycosylphosphatidylinositol) exprimée sur les monocytes. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'HCDM Council (ateliers 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).

L'anticorps MEM-158 réagit avec le CD15, fortement exprimé à la surface des granulocytes. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'HCDM Council (ateliers HLDA VI : WS Code AS A053).

L'anticorps JC159 reconnaît un épitope de la partie extracellulaire du CD235a (glycophorine A), une sialoglycoprotéine exprimée sur les érythroblastes précoces, érythroblastes tardifs, érythroblastes et érythrocytes matures.

L'anticorps MEM-43 réagit avec un épitope bien défini sur CD59 (protectine), une glycoprotéine ancrée (au GPI) exprimée à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'atelier HLDA (ateliers 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).

L'anticorps MEM-75 réagit avec un épitope extracellulaire de l'antigène CD71 exprimé sur des iRBCs immatures. La spécificité de l'anticorps a été confirmée par l'atelier HLDA (ateliers HLDA IV : WS Code A 45 ; HLDA V : WS Code T T-165).

Précision

La précision de la méthode a été déterminée en comparant le dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit avec une méthode interne de laboratoire clinique accrédité par coloration parallèle de 13 patients avec une présence confirmée du phénotype HPN. Les paramètres d'analyse de régression linéaire sont indiqués dans le Tableau 7.

Tableau 7 Analyse de régression linéaire pour les dénombrements relatifs de populations de cellules déficientes en GPI (phénotypes HPN) chez les patients présentant des phénotypes HPN confirmés (comparaison du dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit avec une méthode interne de laboratoire clinique accrédité (cocktail d'anticorps conjugués de différents fabricants et analysé à l'aide de BD FACSCanto™ II))

Sous-ensemble de lymphocytes	n	Pente	Ordonnée à l'origine	R ²	Intervalle [%]
Érythrocytes CD59- CD235a+ de Type III	13	0.99	-0.026	1.00	1.28 - 83.79
iRBCs CD59- CD235a+ de Type III	13	0.99	-0,384	1.00	5.97 - 97.78
Érythrocytes CD59- CD235a+ de Type II	13	1.00	-0,059	1.00	0.13 - 89.92
iRBCs CD59- CD235a+ de Type II	13	0.98	0.141	1.00	0.33 - 74.67
Monocytes ancre GPI- CD157- CD64+	13	1.00	0.060	1.00	2.07 - 99.95
Neutrophiles ancre GPI-CD157- CD15+	13	0.99	0.294	1.00	0.80 - 99.82
Monocytes ancre GPI- CD14- CD64+	13	Non déterminé			2.04 - 99.96
Monocytes CD14- CD157- CD64+	13	Non déterminé			2.17 - 99.96
Neutrophiles CD24- CD157- CD15+	13	Non déterminé			0.80 - 99.83
Neutrophiles ancre GPI-CD24- CD15+	13	Non déterminé			0.81 - 99.80

n = nombre d'échantillons sanguins

Limite de détection / limite de quantification / Assay Cut-off

La limite de détection (LDD) a été déterminée pour chaque population cible (voir le Tableau 5) en tant que valeur moyenne des résultats de 25 donneurs de sang en bonne santé augmentée par l'ajout de trois écarts-types par rapport à la moyenne pour 4 plateformes de cytomètre en flux différentes et exprimée en tant que seuil de dosage dans les Tableaux 8, 9, 10 et 11.

MISE EN GARDE : Le laboratoire clinique doit établir sa propre limite de détection (LDD)/ses propres valeurs de seuil à partir d'un ensemble d'échantillons de patients normaux lorsqu'il utilise un type et/ou une marque de cytomètre différents de ceux spécifiés dans les Tableaux 8 à 11.

Tableau 8 Valeurs de seuil du kit de dosage de l'HPN haute sensibilité DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit pour chaque phénotype HPN combiné à l'incidence du phénotype HPN et les LDQ récupérées sur le cytomètre en flux BD FACSLytic™.

Phénotype HPN	BD FACSLytic™					
	n	Moyenne [%]	É-T [%]	Incidence du phénotype HPN	Seuil (Moyenne + 3*É-T)	LDQ (Moyenne + 10*É-T)
Tube GR (1 000 000 d'événements récupérés ; min. 80 % d'événements de singulets GR)						
Globules rouges CD59- de Type II et de Type III	25	0.003	0.001	5 à 48 événements pour 1 000 000 d'événements (moyenne de 25 événements)	0.005 %	0.012 %
iRBCs CD59- de Type II et Type III	25	0.054	0.061	0 à 5 événements pour 3 000 iRBCs (moyenne de 2 événements)	0.240 %	0.660 %
Tube GB (200 000 événements acquis)						
Monocytes CD157- CD14-	25	0.076	0.041	2 à 24 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 8 événements)	0.20 %	0.49 %
Monocytes ancre GPI- CD14-	25	0.021	0.018	0 à 5 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 2 événements)	0.08 %	0.20 %
Monocytes ancre GPI- CD157-	25	0.014	0.020	0 à 4 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 1 événement)	0.07 %	0.21 %

CD157- CD24- Granulocytes neutrophiles	25	0.006	0.006	0 à 20 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 5 événements)	0.02 %	0.07 %
Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD24-	25	0.006	0.008	0 à 29 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 6 événements)	0.03 %	0.09 %
Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD157-	25	0.002	0.002	0 à 8 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 2 événements)	0.01 %	0.02 %

Tableau 9 Les valeurs de seuil du kit de dosage de l'HPN haute sensibilité DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit pour chaque phénotype HPN avec incidence du phénotype HPN et LDQ récupérées sur le cytomètre en flux BD FACSCanto™ II.

Phénotype HPN	BD FACSCanto™ II					
	n	Moyenne [%]	É-T [%]	Incidence du phénotype HPN	Seuil (Moyenne + 3*É-T)	LDQ (Moyenne + 10*É-T)
Tube GR (1 000 000 d'événements récupérés ; min. 80 % d'événements de singulets GR)						
Globules rouges CD59- de Type II et Type III	25	0.0006	0,0004	1 à 12 événements pour 1 000 000 d'événements (moyenne de 6 événements)	0.002 %	0.004 %
iRBCs CD59- de Type II et Type III	25	0.0657	0.0847	0 à 5 événements pour 1 000 iRBCs (moyenne de 1 événements)	0.320 %	0.913 %
Tube GB (200 000 événements acquis)						
Monocytes CD157- CD14-	25	0.085	0.035	2 à 16 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 8 événements)	0.19 %	0.43 %
Monocytes ancre GPI- CD14-	25	0.086	0.096	0 à 3 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 1 événements)	0.04 %	0.10 %
Monocytes ancre GPI- CD157-	25	0.084	0.019	0 à 7 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 1 événements)	0.06 %	0.20 %
CD157- CD24- Granulocytes neutrophiles	25	0.004	0.052	0 à 17 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 5 événements)	0.02 %	0.06 %

Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD24-	25	0.006	0.010	0 à 32 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 6 événements)	0.03 %	0.10 %
Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD157-	25	0.002	0.002	0 à 8 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 2 événements)	0.01 %	0.02 %

Tableau 10 Valeurs de seuil du kit de dosage de l'HPN haute sensibilité DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit pour chaque phénotype HPN avec incidence du phénotype HPN et LDQ récupérées sur le cytomètre en flux Beckman Coulter Navios EX.

Phénotype HPN	Beckman Coulter Navios EX					
	n	Moyenne [%]	É-T [%]	Incidence du phénotype HPN	Seuil (Moyenne + 3*É-T)	LDQ (Moyenne + 10*É-T)
Tube GR (1 000 000 d'événements récupérés ; min. 80 % d'événements de singulets GR)						
Globules rouges CD59- de Type II et Type III	25	0.007	0.007	4 à 236 événements pour 1 000 000 d'événements (moyenne de 60 événements)	0.029 %	0.081 %
iRBCs CD59- de Type II et Type III	25	0.087	0.100	0 à 6 événements pour 1 000 iRBCs (moyenne de 1 événements)	0.388 %	1.092 %
Tube GB (200 000 événements acquis)						
Monocytes CD157- CD14-	25	0.062	0.027	0 à 23 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 6 événements)	0.14 %	0.33 %
Monocytes ancre GPI- CD14-	25	0.024	0.006	0 à 10 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 2 événements)	0.10 %	0.28 %
Monocytes ancre GPI- CD157-	25	0.007	0.011	0 à 6 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 1 événements)	0.04 %	0.12 %
CD157- CD24- Granulocytes neutrophiles	25	0.012	0.015	0 à 43 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 12 événements)	0.06 %	0.16 %

Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD24-	25	0.005	0.005	0 à 13 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 5 événements)	0.02 %	0.05 %
Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD157-	25	0.002	0.002	0 à 10 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 2 événements)	0.01 %	0.03 %

Tableau 11 Valeurs de seuil du kit de dosage de l'HPN haute sensibilité DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit pour chaque phénotype HPN avec incidence du phénotype HPN et LDQ récupérées sur le cytomètre en flux Beckman Coulter DxFLEx.

Phénotype HPN	Beckman Coulter DxFLEx					
	n	Moyenne [%]	É-T [%]	Incidence du phénotype HPN	Seuil (Moyenne + 3*É-T)	LDQ (Moyenne + 10*É-T)
Tube GR (1 000 000 d'événements récupérés ; min. 80 % d'événements de singulets GR)						
Globules rouges CD59- de Type II et Type III	25	0,015	0.012	5 à 48 événements pour 1 000 000 d'événements (moyenne de 25 événements)	0.049 %	0.129 %
iRBCs CD59- de Type II et Type III	25	0.106	0.152	0 à 5 événements pour 1 000 iRBCs (moyenne de 2 événements)	0.562 %	1.626 %
Tube GB (200 000 événements acquis)						
Monocytes CD157- CD14-	25	0.092	0.068	0 à 27 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 10 événements)	0.30 %	0.77 %
Monocytes ancre GPI- CD14-	25	0.053	0.040	0 à 16 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 6 événements)	0.17 %	0.46 %
Monocytes ancre GPI- CD157-	25	0.005	0.009	0 à 1 événements pour 10 000 monocytes (moyenne de 1 événements)	0.03 %	0.10 %
CD157- CD24- Granulocytes neutrophiles	25	0.010	0.008	0 à 28 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 10 événements)	0.03 %	0.09 %

Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD24-	25	0.008	0.006	0 à 20 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 8 événements)	0.02 %	0.06 %
Granulocytes neutrophiles ancre GPI- CD157-	25	0.002	0.002	0 à 5 événements pour 100 000 neutrophiles (moyenne de 2 événements)	0.01 %	0.02 %

REMARQUE: Pour l'analyse par cytométrie en flux, les cytomètres en flux suivants, y compris la version du logiciel, ont été utilisés :

BD FACSCanto™ II BD FACSDiva Software – version 8.0.2
BD FACSLyric™ BD FACSuite™ Software – version v1.5.0.925
Beckman Coulter DxFLEx CytExpert for DxFLEx – version 2.0.2.18
Beckman Coulter Navios EX Navios EX Software – version 2.2

Pour l'évaluation des données mesurées, la plate-forme d'analyse suivante a été utilisée :

FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - version 10.9.0

12. Performances cliniques

Patients présentant un déficit en GPI

Les données cliniques ont été recueillies sur un site clinique auprès de 19 patients, à la fois en bonne santé ⁽⁶⁾ et présentant un déficit confirmé en GPI ⁽¹³⁾. Les performances cliniques ont été déterminées en comparant le dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit avec une méthode interne de laboratoire clinique accrédité (cocktail d'anticorps conjugués de couleur unique provenant de différents fabricants et analysés à l'aide du BD FACSCanto™ II).

Le déficit en GPI chez les patients a été évalué par rapport à la méthode utilisée (Tableau 12) par détection de cellules déficientes en GPI (clones HPN).

Tableau 12 Performances cliniques du dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Évaluation du déficit en GPI réalisée à l'aide d'une méthode interne de laboratoire clinique accrédité	
		Déficit en GPI	État normal
Évaluation du déficit en GPI à l'aide du dispositif DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Déficit en GPI	13 patients	0 patient
	État normal	0 patient	6 patient

13. Valeurs attendues

Intervalle de référence

Dans la population normale, aucun déficit en GPI n'est détecté et toutes les valeurs de pourcentage du phénotype d'HPN devraient être inférieures au assay Cut-off (LOD) ⁽⁶⁾.

14. Limitations

Aucune limitation d'utilisation pour des types spécifiques de maladies, comme les anémies, n'a été identifiée.

Le signalement des déficits en GPI est limité conformément aux directives de pointe actuelles publiées ⁽⁶⁾.

15. Références

- 1) Borowitz, MJ et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):211-30. doi: 10.1002/cyto.b.20525.
- 2) Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2012; 82B: 195–208.

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

- 13) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x.
- 14) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.
- 15) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem.* 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
- 16) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
- 17) Hervé Lecoœur, 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. Résumé des caractéristiques de sécurité et des performances

Le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances sera disponible dans la base de données Eudamed à l'adresse

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. D'ici là, le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances est disponible sur demande.

17. Utilisation de marques tierces

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™ et BD Multitest™ sont des marques déposées de Becton, Dickinson and Company, Cy™ est une marque déposée de Cytiva. VenturiOne® est une marque déposée d'Applied Cytometry, Infinicyt™ est une marque déposée de Cytognos S.L.. SPHERO™ COMPtrol est une marque déposée de Spherotech, Inc..

18. Historique des révisions

Version 2, ED7750_IFU_v2

- 1) Ajout d'interférences endogènes et exogènes.
- 2) La section « Règles de l'algorithme de signalement des déficits en GPI » a été mise à jour.
- 3) Section 13. Valeurs attendues - corrections mineures du texte.
- 4) Mise à jour des références.
- 5) Ajout du numéro d'identification de l'organisme notifié.
- 6) Ajout du nouveau numéro de chapitre 16. Résumé des caractéristiques de sécurité et des performances.

19. Fabricant

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

Coordonnées

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

20. Représentants autorisés

Suisse Personne responsable

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

REMARQUE : Tout incident grave survenu en relation avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente locale.