

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit 25 test | N. Cat. ED7750



Istruzioni per l'uso (IT)

Versione: ED7750_IFU_v2_IT

Data di pubblicazione: 25-10-2024

Simboli utilizzati nell'etichettatura del dispositivo

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Tenere lontano dalla luce del sole
	Marcatura CE di dichiarazione di conformità Numero identificativo dell'organismo notificato		Tenere all'asciutto Conservare al riparo dall'umidità
	Produttore		Precauzioni
	Codice Unico di Identificazione		Non riutilizzare
	Consultare le istruzioni per l'uso		Contiene <n> provette per test monouso
	Contenuto sufficiente per <n> test		Soluzione concentrata (10x)
	Numero di catalogo		Contenuti
	Codice di lotto		Marchio UKCA
	Data di scadenza		
	Limite di temperatura		

1. Uso Previsto

Il DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit è un kit per saggio ad alta sensibilità utilizzato per l'individuazione e la quantificazione tramite citofluorimetria di cellule con carenza di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) nel sangue umano intero.

Cosa viene rilevato e/o misurato

Il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit individua e quantifica le cellule con carenza di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) (cloni EPN) in percentuali di:

- Cellule CD59 dim o CD59- di tutti gli eritrociti (CD235a+)
- Cellule CD59 dim o CD59- di tutti i iRBCs (CD235a+CD71+)
- Cellule CD14-, CD157- e ancora GPI- di tutti i monociti (CD45+CD64+)
- Cellule CD24-, CD157- e ancora GPI- di tutti i granulociti neutrofili (CD45+CD15+)

Funzione del dispositivo

Questo dispositivo è utilizzato per la diagnosi e il monitoraggio di pazienti che soffrono di emoglobinuria parossistica notturna (EPN) accertata o sospetta e disturbi riconducibili ⁽¹⁾.

Contesto di stato fisiologico o patologico

L'emoglobinuria parossistica notturna (EPN) è un disturbo raro delle cellule staminali ematopoietiche derivante dall'espansione clonale non maligna di cellule che hanno acquisito una mutazione somatica a carico del gene fosfatidilinositolo glicano ancora biosintesi, classe A (PIG-A). Le mutazioni del gene PIG-A comportano l'incapacità di esprimere le proteine ancorate al glicosilfosfatidilinositolo (GPI) sulla superficie cellulare.

Il dispositivo rileva i granulociti neutrofili e i monociti con carenza di GPI ⁽¹⁾, nonché gli eritrociti con carenza di GPI totale (tipo III) e parziale (tipo II) ^(2,3,4,5,6) per valutare la dimensione del clone EPN.

Inoltre, rileva i iRBCs (eritrociti che non hanno raggiunto la piena maturazione) con carenza di GPI in pazienti che ricevono trasfusioni ematiche quando è difficile determinare gli eritrociti EPN ⁽⁷⁾.

Tipo di test

Non automatizzato

Quantitativo

Tipo di campione richiesto

Campione di sangue intero periferico umano con anticoagulanti (EDTA, eparina, citrato) ⁽¹⁾

Popolazione da sottoporre al test

Pazienti con:

- marcatori biologici di emolisi, nel caso siano state escluse altre cause più comuni di emolisi,
- trombosi inspiegabile in giovane età,
- trombosi diagnosticate in un sito insolito,
- anemia aplastica (AA) ereditata o acquisita,
- sindrome mielodisplastica (SMD),
- citopenia ingiustificata, nei quali l'AA o l'SMD sono considerazioni di diagnosi differenziale ⁽¹⁾

2. Utilizzatore previsto

Il dispositivo è destinato esclusivamente all'uso professionale in laboratorio. Non destinato ad analisi decentrate (near-patient testing) o a test autodiagnostico.

Requisiti di qualificazione

L'utilizzatore previsto deve disporre di competenze all'avanguardia nelle analisi di citometria a flusso di cellule umane, nelle tecniche di laboratorio standard, comprese abilità di pipettaggio, manipolazione sicura e corretta di campioni biologici umani.

L'utilizzatore previsto deve operare in conformità alla norma EN ISO 15189 o ad altre disposizioni nazionali, ove applicabile.

3. Principio del test

Il principio del test si basa sull'individuazione dell'ancora GPI e delle proteine ancorate al GPI presenti sulla superficie delle cellule ematiche umane. Gli anticorpi monoclonali e la proaerolisina ricombinante utilizzati nel test sono coniugati con diversi fluorocromi che, durante l'acquisizione di un campione di sangue colorato, vengono eccitati da un fascio laser proveniente da un citofluorimetro. La conseguente fluorescenza (emissione di luce) da ciascun fluorocromo presente su una cellula ematica acquisita è raccolta e analizzata dallo strumento. L'intensità della fluorescenza è direttamente proporzionale alla densità di espressione dell'antigene in una cellula che permette la separazione di diverse sottopopolazioni cellulari.

4. Reagenti forniti

Contenuti

Il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit è sufficiente per esaminare 25 pazienti e contiene i seguenti reagenti:

PNH High-Sensitivity Assay (25 buste). Ogni busta contiene 1 provetta monouso **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) con tappo e codifica cromatica (striscia ciano) e

1 provetta monouso **PNH RBC 3-color** (ED7750-2) con tappo e codifica cromatica (striscia rossa), contenenti combinazioni premiscelate di reagenti marcati con fluorocromi essiccati con ingredienti stabilizzanti presenti come strato sul fondo delle provette (12 x 75 mm), vedere Tabelle 1 e 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 flacone) contenente 15 ml di soluzione tampone a base di formaldeide concentrata (10X).

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 busta) contenente 10 provette monouso con tappo, ciascuna contenente un reagente marcato con fluorocromi essiccato con gli ingredienti stabilizzanti e presente come strato sul fondo della provetta (12 x 75 mm).

NOTA: Il set di compensazione PNH è utilizzato esclusivamente per impostare la compensazione. I singoli reagenti marcati con fluorocromi (vedere Tabella 1 e Tabella 2) permettono di svolgere la procedura di compensazione in modo agevole e accurato.

Composizione

Tabella 1 Descrizione dei principi attivi di PNH WBC 7-color

Antigene	Fluorocromo	Clone	Isotipo
Ancora del 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

Tabella 2 Descrizione dei principi attivi di PNH RBC 3-color

Antigene	Fluorocromo	Clone	Isotipo
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Materiali necessari ma non forniti

Acqua deionizzata (grado reagente)

Tampone fosfato salino (PBS 1X), pH 7,2 – 7,4

Particelle per la compensazione della citofluorimetria (Spherotech SPHERO™ COMPtrol Kit, n. di cat. CMLgP-50-3K o particelle di compensazione equivalenti)

6. Attrezzatura necessaria

Pipetta automatica con puntali monouso (100 µl – 5 ml) per pipettare campioni e reagenti

Dosatore per liquidi o pipetta con puntali monouso (2 ml) per il dosaggio della soluzione per la lisi degli eritrociti

Agitatore vortex

Provette per centrifuga coniche in polipropilene (da 15 ml o 50 ml) per la preparazione dei campioni

Centrifuga con adattatori per rotori adeguati a provette a fondo tondo da 12 x 75 mm

Citofluorimetro con tre laser di eccitazione (488 nm, ~635 nm e 405 nm), rilevatori di scatter, filtri ottici e rilevatori di emissioni idonei alla raccolta dei segnali dei fluorocromi forniti nella Tabella 3.

Tabella 3 Caratteristiche spettrali dei fluorocromi utilizzati dal dispositivo

Fluorocromo	Eccitazione [nm]	Emissione [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

NOTA: il dispositivo è stato testato con citofluorimetri BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter) e DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Conservazione e manipolazione

Conservare a 20-30 °C.

Evitare l'esposizione prolungata alla luce.

Conservare al riparo dall'umidità.

ATTENZIONE: prodotto sensibile all'umidità. Non aprire la busta in alluminio fino al primo uso.

Per maggiori informazioni sulle condizioni di conservazione e sulla stabilità delle soluzioni di lavoro (se del caso), consultare la sezione 10 Procedura (Preparazione dei reagenti forniti).

8. Avvertenze, precauzioni e limitazioni d'impiego

Classificazione dei pericoli GHS

AVVERTENZA: la soluzione di lisi (ED7750-3) contiene formaldeide (Numero CAS 50-00-0) e metanolo (Numero CAS 67-56-1) in concentrazioni classificate come pericolose.

Elementi nell'etichetta	Avvertenze
	Pericolo
	
Frase H	H315: Provoca irritazione cutanea. H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H319: Provoca grave irritazione oculare. H335: Può irritare le vie respiratorie. H341: Sospettato di provocare alterazioni genetiche. H350: Può provocare il cancro. H371: Può provocare danni agli organi. H373: Può provocare danni dei reni in caso di esposizione prolungata o ripetuta se ingerito. H302+H312+H332: Nocivo se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.
Frase P	P201: Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. P260: Non respirare i vapori. P264: Lavare accuratamente per le mani e le parti del corpo più esposte dopo l'uso. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P301+P312: IN CASO DI INGESTIONE: In presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/medico.
P302+P352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e saponi.
P305+P351+P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P308+P313: IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P314: In caso di malessere, consultare un medico.
P333+P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle, consultare un medico.
P362+P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Consultare la scheda di dati di sicurezza (SDS) disponibile sulla pagina del prodotto sul sito www.exbio.cz per informazioni complete sui rischi associati alle sostanze chimiche e alle miscele contenute nel prodotto, e su come devono essere manipolate e smaltite.

Rischio biologico

I campioni biologici umani, i campioni ematici ed eventuali materiali che vengono a contatto con essi sono sempre considerati materiali infetti.

Utilizzare dispositivi di protezione e sicurezza individuale per evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose.

Seguire tutte le norme, i regolamenti e le procedure applicabili per la manipolazione e lo smaltimento di materiali infetti.

Segni di deterioramento

Il reagente fornito appare normalmente come uno strato essiccato trasparente sul fondo della provetta. Non utilizzare il reagente se si osservano alterazioni nell'aspetto, ad esempio presenza di umidità all'interno della provetta.

Limiti di utilizzo

Non utilizzare dopo la data di scadenza riportata sulle etichette del prodotto.

Non riutilizzare le provette.

9. Campione

Utilizzare sangue venoso periferico raccolto nel contenitore per campioni classificato come dispositivo medico, con anticoagulanti EDTA, eparina o ACD (destrosio citrato) ⁽²⁾.

Utilizzare solo campioni non trattati. Non utilizzare campioni sottoposti a prelievi, lavati o diluiti.

Processare il campione ematico entro e non oltre 48 ore dopo il prelievo. Conservare il campione a temperatura di laboratorio (20-25°C). Non refrigerare il campione.

Interferenza endogena

Sulla base delle ricerche effettuate nella letteratura scientifica, nella Tabella 4 sono riportate le fonti di interferenza endogena.

Tabella 4 Interferenza endogena del dispositivo

Interferenza endogena	Impatto	Riferimento
Albumina	L'albumina può interferire in concentrazioni elevate a causa della sua capacità di legare e rilasciare grandi quantità di leganti.	9, 10, 26
Bilirubina (ittero) (non coniugata)	La bilirubina aumenta il fondo di fluorescenza delle cellule a causa della sua elevata autofluorescenza.	13, 15, 19
Detriti cellulari (dopo la lisi)	I detriti cellulari possono fornire un conteggio impreciso delle cellule e impoverire gli anticorpi all'interno del dispositivo.	12, 16
Eritrociti	Con una lisi insufficiente, i globuli rossi presenti nel campione possono dare luogo a un conteggio errato delle cellule.	17
Emoglobina	I campioni sottoposti a emolisi possono produrre risultati inaffidabili.	14
Anticorpi umani anti-murini	Può influire sulla funzionalità del dispositivo (capacità di legarsi agli antigeni della superficie cellulare).	11, 21, 22, 23, 24, 25
Immunoglobuline	Può influire sulla conta dei sottogruppi linfocitari.	12
Fattori reumatoidi	La presenza del fattore reumatoide (RF) interferisce con i test di immunodosaggio multiplex (MIA).	18
Trigliceridi	Elevati livelli circolanti di lipidi possono influenzare l'analisi in citometria a flusso di alcune popolazioni di cellule ematiche.	20

Interferenza esogena

Secondo i lavori pubblicati da Sutherland et. al.⁽⁷⁾, i globuli rossi provenienti da trasfusioni di sangue costituiscono un'importante interferenza nell'analisi della PNH (Emoglobinuria Parossistica Notturna) nei pazienti con un clone di PNH di grandi dimensioni che presentano emolisi extravascolare. Gli eritrociti sani ricevuti

tramite trasfusione influenzano significativamente il monitoraggio del clone PNH nella linea dei globuli rossi (RBC). L'aggiunta del CD71 migliora significativamente la capacità di analizzare le dimensioni dei cloni di PNH nella linea RBC, indipendentemente dallo stato emolitico e/o trasfusionale del paziente. Il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit supera questo problema in base alle linee guida sopra citate offrendo l'antigene CD71 per l'identificazione dei globuli rossi immaturi (iRBC), dove gli iRBC esprimono anche l'antigene CD59 ancorato a GPI. Nelle sacche trasfusionali, gli iRBC sono solitamente rappresentati in quantità molto bassa ⁽²⁷⁾. D'altra parte, i pazienti con emolisi extravascolare causata dalla PNH presentano un aumento della conta degli iRBC a causa della rapida perdita di eritrociti ⁽²⁸⁾. Pertanto, con l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale CD71 per l'identificazione degli iRBC, il medico ha a disposizione un monitoraggio più accurato della progressione della PNH, segnalata dalla perdita dell'antigene CD59 sugli iRBC, superando l'interferenza degli RBC esogeni provenienti dalle sacche trasfusionali. Il DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit contiene l'anticorpo anti-CD71 umano e consente di utilizzare le più recenti linee guida per il rilevamento e la quantificazione dei cloni di PNH.

10.Procedura

Preparazione dei reagenti forniti

PNH High-Sensitivity Assay

Non è necessario preparare il reagente, poiché è fornito in provette monouso.

Lysing Solution

Portare il reagente a temperatura ambiente prima dell'uso.

Il reagente è concentrato 10X e deve essere diluito con acqua deionizzata prima di essere utilizzato (1 volume di soluzione concentrata e 9 volumi di acqua deionizzata). Dopo la prima apertura, il reagente mantiene le sue caratteristiche di prestazione fino alla data di scadenza, se conservato alle condizioni indicate nel suo contenitore primario originale.

La soluzione lisante diluita (1X) è stabile per 1 mese se conservata in un dispenser di liquidi o in un contenitore chiuso a temperatura ambiente.

Preparazione dei materiali necessari ma non forniti

Particelle di compensazione

Preparare la soluzione di lavoro delle particelle di compensazione della citofluorimetria seguendo le istruzioni del produttore.

Impostazione della compensazione

Prima dell'analisi delle provette colorate PNH RBC 3-color e PNH WBC 7-color, acquisire le provette del set di compensazione utilizzando la stessa impostazione del citofluorimetro.

ATTENZIONE: le procedure di preparazione della compensazione di Provette PNH RBC 3-color e PNH WBC 7-color differiscono per tipo di preparazione del campione e colorazione del campione.

Provette di compensazione PNH RBC 3-color (striscia rossa)

1. Aggiungere lo SPHERO™ COMPtrol Kit o particelle di compensazione equivalenti sul fondo di ciascuna provetta di compensazione monocolori.
2. Agitare con vortex e incubare per 20 minuti al buio a temperatura ambiente.
3. Aggiungere 4 ml di PBS 1X a ogni provetta di compensazione. Centrifugare per 5 minuti a 300 g.
4. Scartare il soprinatante senza alterare le particelle di compensazione e aggiungere 0,1 ml di PBS 1X a ogni provetta di compensazione.
5. Prima dell'analisi del campione colorato, impostare la tensione dei rilevatori di fluorescenza interessati. La tensione di un rilevatore fotomoltiplicatore (PMT) deve essere sufficientemente alta da permettere che un minimo di eventi colorati negativamente interferisca con il canale 0 sull'asse di fluorescenza. Inoltre, il rilevatore PMT non deve superare i valori in cui gli eventi positivi sono premuti sull'asse destro.
6. Acquisire immediatamente le provette di compensazione colorate usando il citofluorimetro.
7. Calcolare la matrice di compensazione di PNH RBC 3-color nel software di citometria sviluppato dal produttore o nel software dedicato all'analisi offline dei dati di citometria. Utilizzare questa matrice di compensazione per tutte le provette del lotto di PNH RBC 3-color attuale.

ATTENZIONE: una volta che sono state fissate per il lotto specifico di PNH RBC 3-color, non modificare le impostazioni dei rilevatori di fluorescenza: ciò permetterà di mantenere le stesse impostazioni di acquisizione della matrice di compensazione e gli stessi risultati di compensazione.

Provette di compensazione PNH WBC 7-color (striscia ciano)

1. Aggiungere 50 µl di acqua deionizzata sul fondo di ogni provetta di compensazione monocolori e agitare vigorosamente con vortex dai 7 ai 10 secondi.
2. Aggiungere 100 µl di sangue intero periferico a ciascuna provetta di compensazione monocolori e agitare con vortex vigorosamente.
3. Incubare per 20 minuti al buio a temperatura ambiente.
4. Aggiungere 2 ml di soluzione di lisi diluita (1X) a ogni provetta di

compensazione.

5. Incubare per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.
6. Centrifugare per 5 minuti a 300 g, scartare il sopranatante e risospendere il pellet cellulare in 2 ml di PBS 1X.
7. Centrifugare per 5 minuti a 300 g, scartare il sopranatante e risospendere il pellet cellulare in 0,2 ml di PBS 1X.
8. Prima dell'analisi del campione colorato, impostare la tensione dei rilevatori di fluorescenza interessati. La tensione di un rilevatore fotomoltiplicatore (PMT) deve essere sufficientemente alta da permettere che un minimo di eventi colorati negativamente interferisca con il canale 0 sull'asse di fluorescenza. Inoltre, il rilevatore PMT non deve superare i valori in cui gli eventi positivi sono premuti sull'asse destro.
9. Acquisire immediatamente le provette di compensazione colorate usando il citofluorimetro.
10. Calcolare la matrice di compensazione di PNH WBC 7-color nel software di citometria sviluppato dal produttore o nel software dedicato all'analisi offline dei dati di citometria. Utilizzare questa matrice di compensazione per tutte le provette del lotto di PNH WBC 7-color attuale.

ATTENZIONE: una volta che sono state fissate per il lotto specifico di PNH WBC 7-color, non modificare le impostazioni dei rilevatori di fluorescenza: ciò permetterà di mantenere le stesse impostazioni di acquisizione della matrice di compensazione e gli stessi risultati di compensazione.

Preparazione del campione

Per procedere all'individuazione e alla differenziazione di cloni EPN negli eritrociti utilizzando la provetta PNH RBC 3-color è necessario preparare il campione prima della procedura di colorazione.

AVVISO: prima di processare il campione, assicurarsi di aver impostato adeguatamente il citometro a flusso.

1. Etichettare una provetta conica in polipropilene con l'identificazione del campione ematico esaminato.
2. Pipettare 10 µl di campione di sangue ben mescolato sul fondo della provetta conica etichettata.
3. Diluire il campione ematico in un rapporto 1:100 con 1 ml di PBS 1X e mescolare a mano oscillando per 5 secondi.

ATTENZIONE: la forma classica di EPN è dominata dall'emolisi intravascolare. Prima di diluire il campione ematico, consultare le conte di globuli rossi (RBC) dall'analizzatore ematologico di modo da ottenere la conta RBC del campione ematico diluito nell'intervallo di $3 - 5 \times 10^7$ / ml di sangue diluito e regolare il fattore di diluizione in base alla necessità per acquisire una conta sufficiente di RBC nel citofluorimetro.

4. Procedere alla colorazione del campione immediatamente dopo la diluizione del campione.

Per procedere all'individuazione di cellule con carenza di GPI nei granulociti neutrofili e nei monociti utilizzando la provetta PNH RBC 7-color non è necessario preparare il campione prima della procedura di colorazione.

Colorazione del campione – Provetta PNH RBC 3-color (striscia rossa)

1. Etichettare una provetta PNH RBC 3-color con l'identificazione del campione ematico esaminato.
2. Pipettare 50 µl di campione di sangue diluito ben mescolato sul fondo della provetta PNH RBC 3-color.

ATTENZIONE: evitare di pipettare il sangue sul lato della provetta. Se uno striscio o una gocciolina di sangue rimane sul lato della provetta, non si colorerà con il reagente, quindi il risultato del test potrebbe non essere valido.

3. Agitare vigorosamente con vortex dai 7 ai 10 secondi.
ATTENZIONE: abbreviare il tempo di utilizzo di vortex può influenzare i risultati del test.
4. Incubare la provetta PNH RBC 3-color per 20 minuti al buio a temperatura ambiente.
5. Aggiungere 4 ml di PBS 1X alla provetta PNH RBC 3-color.
6. Centrifugare la provetta PNH RBC 3-color a 300 g per 5 minuti.
7. Scartare il sopranatante senza alterare il pellet cellulare e aggiungere 0,5 ml di PBS 1X alla provetta PNH RBC 3-color.
8. Agitare brevemente con vortex per risospendere il pellet cellulare.

Acquisire il campione colorato usando il citofluorimetro. Se il campione colorato non è acquisito immediatamente, tappare la provetta del test, conservarlo al buio a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e analizzarlo entro 2 ore.

ATTENZIONE: rompere gli aggregati cellulari nel campione colorato facendo scorrere la provetta contro il rack per provette immediatamente prima dell'acquisizione nel citofluorimetro. Una quantità eccessiva di aggregati di

globuli rossi può influenzare i risultati del test.

Colorazione del campione – Provetta PNH WBC 7-color (striscia ciano)

1. Etichettare una provetta PNH WBC 7-color con l'identificazione del campione ematico esaminato.
2. Aggiungere 50 µl di acqua deionizzata alla provetta PNH WBC 7-color. Agitare vigorosamente con vortex dai 7 ai 10 secondi.

ATTENZIONE: abbreviare il tempo di utilizzo di vortex può influenzare i risultati del test.

3. Pipettare 100 µl di campione di sangue ben mescolato sul fondo della provetta PNH WBC 7-color e agitare vigorosamente con vortex.

ATTENZIONE: evitare di pipettare il sangue sul lato della provetta. Se uno striscio o una gocciolina di sangue rimane sul lato della provetta, non si colorerà con il reagente, quindi il risultato del test potrebbe non essere valido.

4. Incubare per 20 minuti al buio a temperatura ambiente.
5. Aggiungere 2 ml di soluzione di lavoro per la lisi degli eritrociti 1X alla provetta PNH WBC 7-color.
6. Incubare per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.
7. Centrifugare la provetta PNH WBC 7-color a 300 g per 5 minuti.
8. Scartare il sopranatante senza alterare il pellet cellulare e aggiungere 2 ml di PBS 1X alla provetta.
9. Centrifugare la provetta PNH WBC 7-color a 300 g per 5 minuti.
10. Scartare il sopranatante senza alterare il pellet cellulare e aggiungere 0,2 ml di PBS 1X alla provetta.
11. Agitare brevemente con vortex per risospendere il pellet cellulare.

Acquisire il campione colorato usando il citofluorimetro. Se il campione colorato non è acquisito immediatamente, chiudere la provetta con il tappo, conservarla al buio a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e analizzare entro 24 ore.

Analisi citofluorimetrica

Il citofluorimetro selezionato per l'uso con il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit deve essere regolarmente calibrato utilizzando microsfero fluorescenti per garantire una stabile sensibilità dei rilevatori, secondo le indicazioni del produttore del citometro.

Se non mantenuto correttamente, il citofluorimetro può produrre risultati errati.

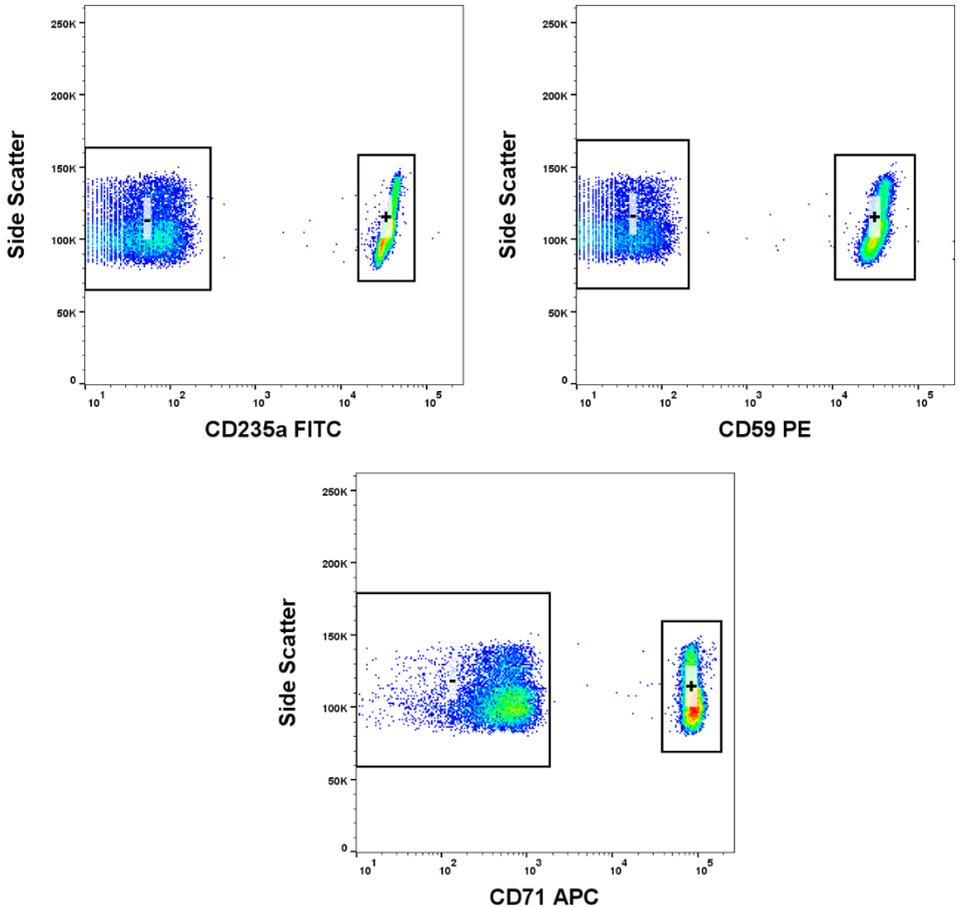
Per i laser e i rilevatori di fluorescenza fare riferimento alle specifiche tecniche del citometro fornite dal produttore, in base alle caratteristiche di eccitazione ed emissione dei fluorocromi indicate nella Sezione 6 Attrezzatura necessaria.

Per l'analisi dei dati misurati, è possibile utilizzare il software del citometro sviluppato dal produttore, o un software specifico progettato per l'analisi dei dati citometrici offline (ad esempio FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analisi delle provette di compensazione PNH RBC 3-color (striscia rossa)

Visualizzare i dati non compensati per ciascuna provetta di compensazione in un dot plot side-scatter (SSC) vs “fluorocromo da compensare”. Impostare i gate per le particelle di compensazione di citometria positive (+) e negative (-) come illustrato nella Figura 1.

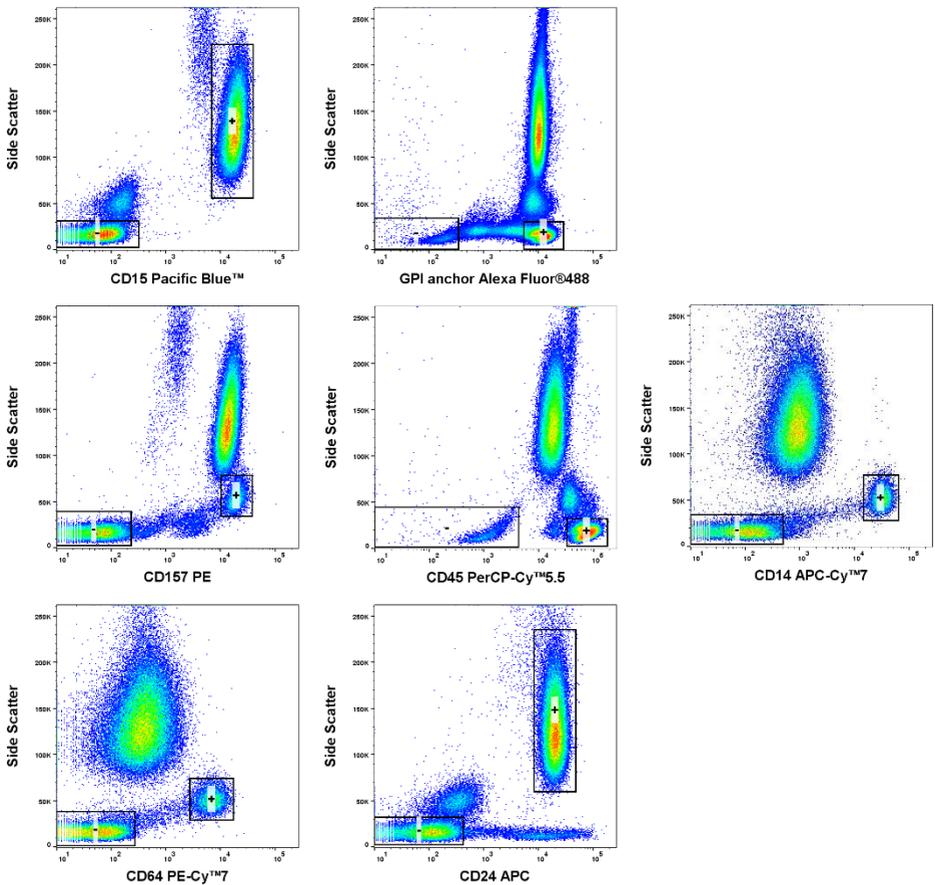
Figura 1 Identificazione di particelle di compensazione di citometria positive (+) e negative (-) nelle provette di compensazione (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Analisi delle provette di compensazione PNH WBC 7-color (striscia ciano)

Visualizzare i dati non compensati per ciascuna provetta di compensazione in un dot plot side-scatter (SSC) vs "fluorocromo da compensare". Impostare i gate per le popolazioni più positive (+) e più negative (-) come illustrato nella Figura 2.

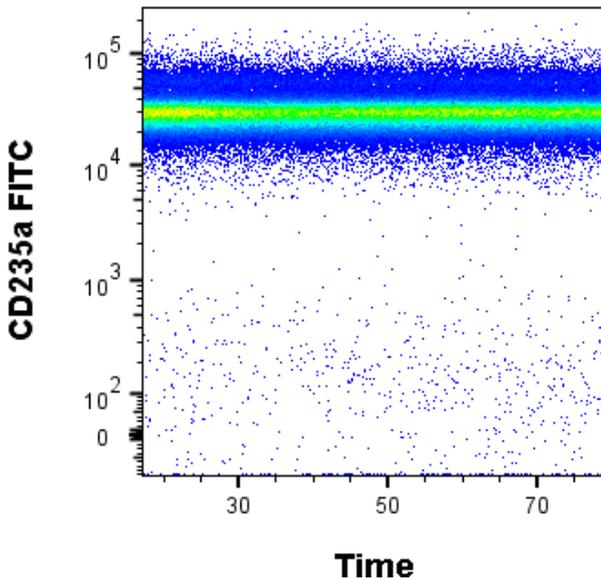
Figura 2 Identificazione degli eventi più positivi (+) e più negativi (-) nelle provette di compensazione (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Provetta PNH RBC 3-color (striscia rossa)

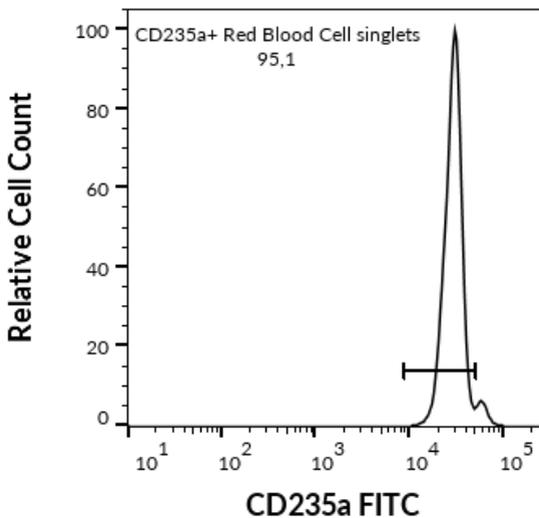
A causa di una bassa conta di iRBCs nel campione ematico diluito, acquisire 500.000–1.500.000 eventi di eritrociti da analizzare. L'acquisizione di ≥ 500.000 eventi comporta un allungamento dei tempi di acquisizione. Ciò potrebbe influenzare l'equilibrio del complesso anticorpo-antigene e la diminuzione della fluorescenza di CD235a FITC. Monitorare sempre la stabilità dell'intensità della fluorescenza durante il tempo di acquisizione (Figura 3).

Figura 3 Tutti gli eventi acquisiti in un dot plot CD235a FITC vs. Tempo (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Visualizzare i dati compensati sotto forma di istogramma nel quale l'asse X rappresenta l'intensità di fluorescenza nel canale FITC. Impostare il gate "RBC singoletti CD235a+" (Figura 4).

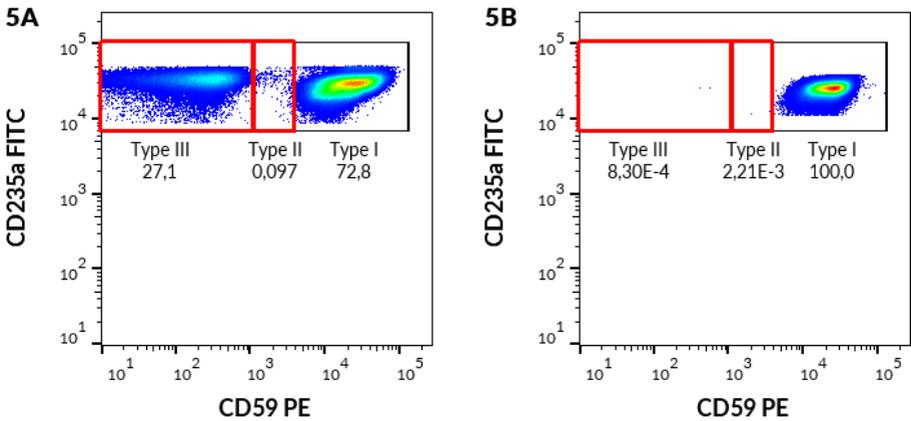
Figura 4 Delineazione di RBC singoletti CD235a+ (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Eritrociti

Visualizzare gli RBC singoli CD235a+ in un dot plot CD59 PE vs CD235a FITC. Separare gli eventi in tre popolazioni utilizzando tre gate adeguati (Figura 5) e calcolare la percentuale di eventi nelle regioni di Tipo I, Tipo II e Tipo III.

Figura 5 RBC singoli CD235a+ in un dot plot CD59 PE vs CD235a FITC (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).
A) paziente con clone EPN; B) donatore sano

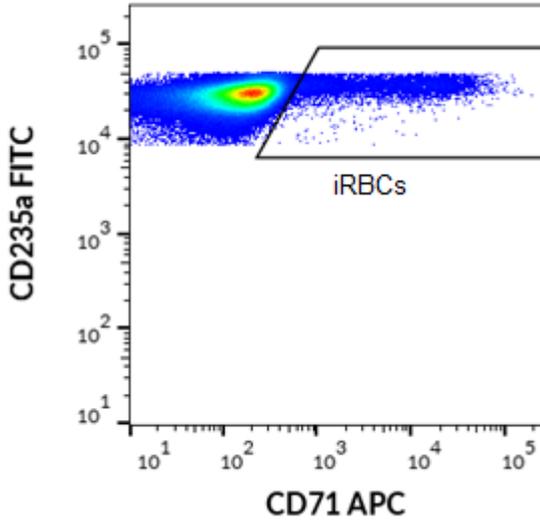


iRBCs (eritrociti che non hanno raggiunto la piena maturazione)

Visualizzare gli RBC singoli CD235a+ in un dot-plot CD71 APC vs CD235a FITC e separare i iRBCs CD71+ (Figura 6).

Figura 6 RBC singoli CD235a+ in un dot plot CD71 APC vs CD235a FITC.

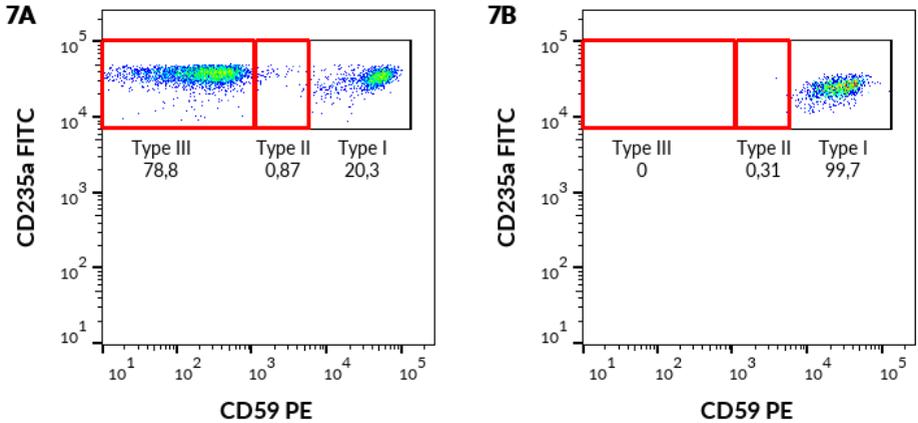
Delineazione di iRBCs CD71+ (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Visualizzare i iRBCs CD71+ in un dot plot CD59 PE vs CD235a FITC. Separare gli eventi in tre popolazioni utilizzando tre gate adeguati (Figura 7) e calcolare la percentuale di eventi nelle regioni di Tipo I, Tipo II e Tipo III.

Figura 7 iRBCs CD71+ in un dot plot CD59 PE vs CD235a+ FITC (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).

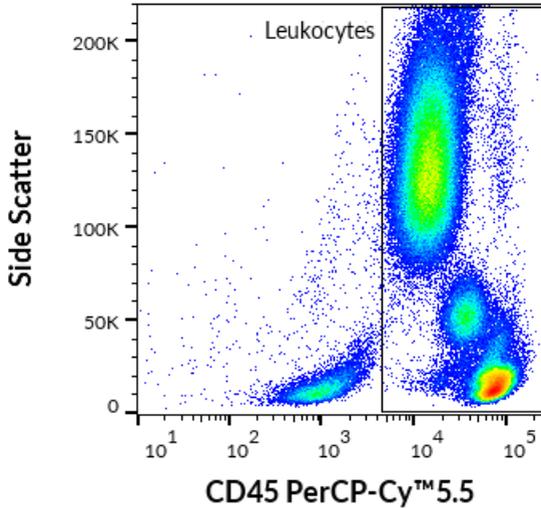
A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Provetta PNH WBC 7-color (striscia ciano)

Acquisire almeno 200.000 eventi da analizzare. Visualizzare i dati compensati in un dot plot side-scatter vs intensità della fluorescenza in PerCP-Cy™ 5.5. Impostare il gate sui leucociti CD45+ come illustrato nella Figura 8.

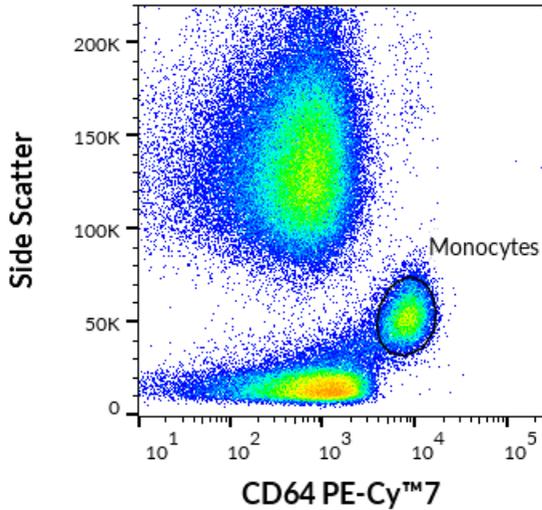
Figura 8 Delineazione di leucociti CD45+ (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Monociti

Visualizzare i leucociti CD45+ in un dot-plot side-scatter vs CD64 PE-Cy™7 e delimitare i monociti CD64+ come illustrato nella Figura 9.

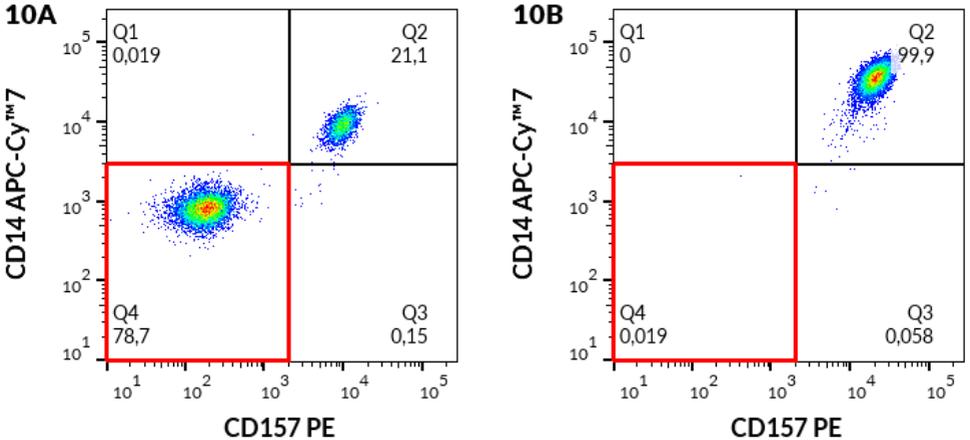
Figura 9 Delineazione di monociti CD64+ dai leucociti (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Visualizzare i monociti CD64+ in un dot-plot CD157 PE vs CD14 APC-Cy™7 (Figura 10). Impostare gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione CD157-CD14- nel quadrante Q4.

Figura 10 Monociti CD64+ in un dot plot CD157 PE vs CD14 APC-Cy™7 (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).

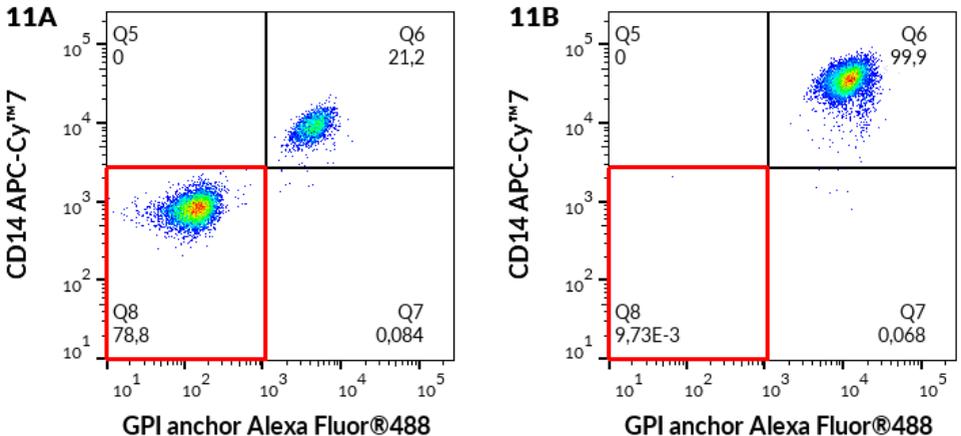
A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Quindi visualizzare gli stessi monociti CD64+ in un dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD14 APC-Cy™7 (Figura 11). Impostare gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione CD14- ancora GPI- nel quadrante Q4.

Figura 11 Monociti CD64+ in un dot plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD14 APC Cy™7 (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).

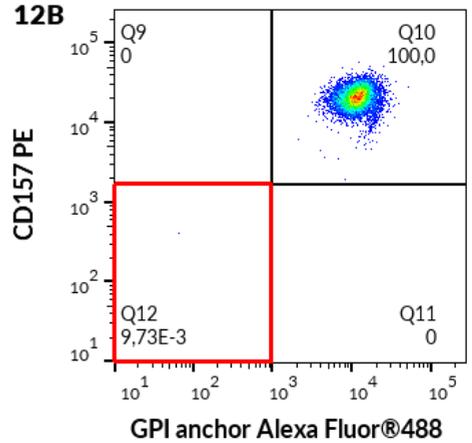
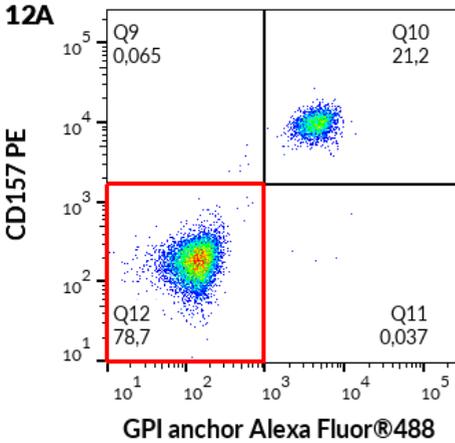
A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Quindi visualizzare gli stessi CD64+ monociti in un dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD157 PE (Figura 12). Impostare i gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione ancora GPI- CD157- nel quadrante Q4.

Figura 12 Monociti CD64+ in un dot plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD157 PE (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).

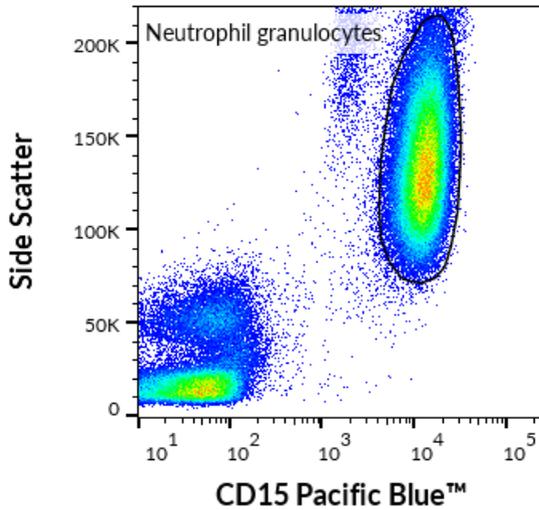
A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Granulociti neutrofilii

Visualizzare i leucociti CD45+ in un dot-plot side-scatter vs CD15 Pacific Blue™ e separare i granulociti neutrofilii CD15+ come illustrato nella Figura 13.

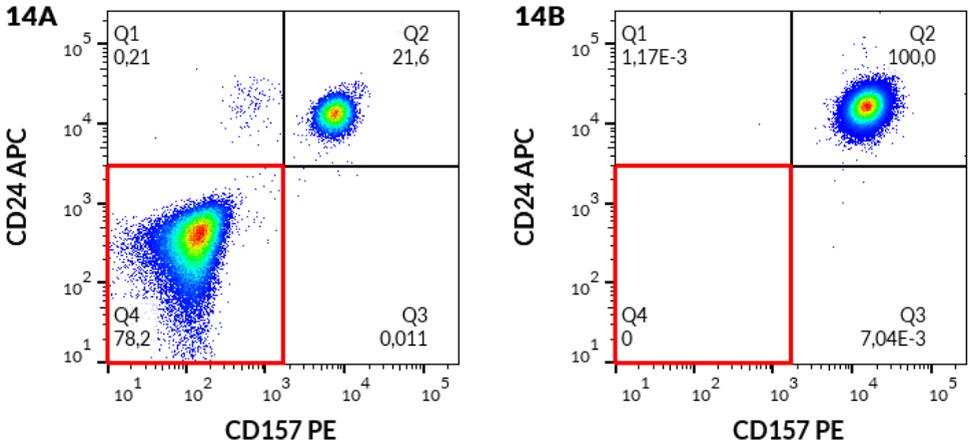
Figura 13 Delineazione di granulociti neutrofilii CD15+ dai leucociti (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



Visualizzare i granulociti neutrofili CD15+ in un dot-plot CD157 PE vs CD24 APC come illustrato nella Figura 14. Impostare gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione CD157- CD24- nel quadrante Q4.

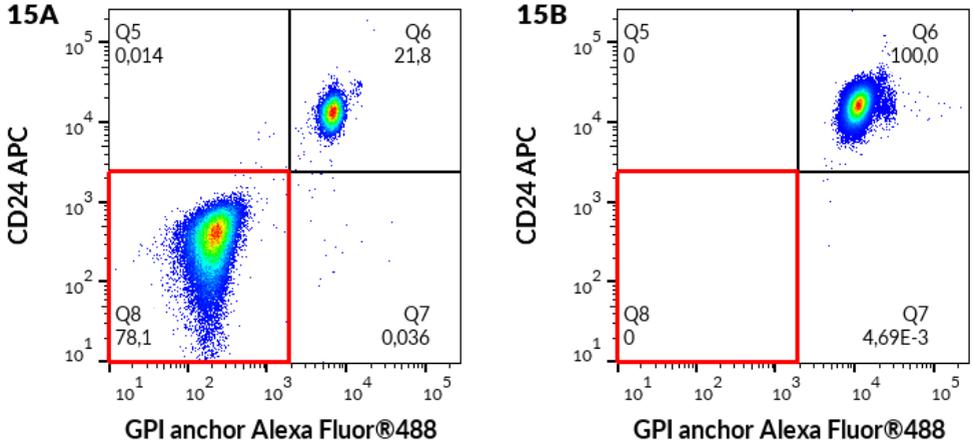
Figura 14 Granulociti neutrofili CD15+ in un dot-plot CD157 PE vs CD24 APC (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).

A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



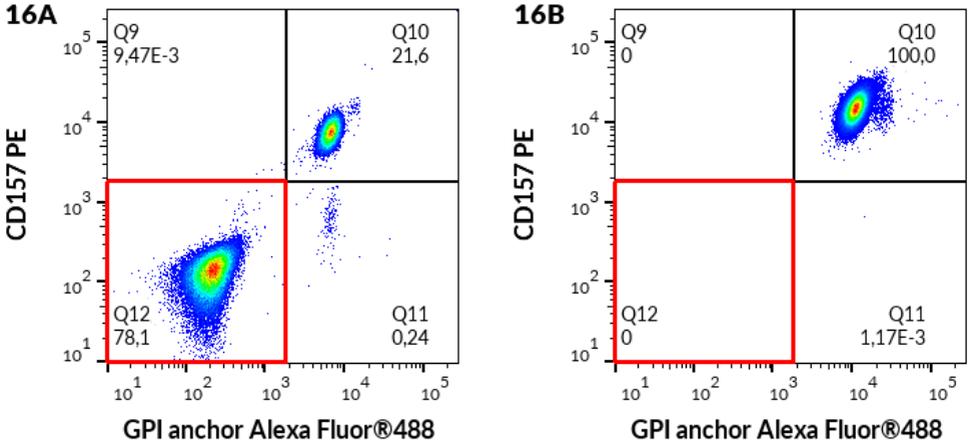
Quindi visualizzare gli stessi granulociti neutrofili CD15+ in un dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD24 APC, impostare gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione ancora GPI- CD24- nel quadrante Q4 come illustrato nella Figura 15.

Figura 15 Granulociti neutrofili CD15+ in un dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD24 APC (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).
A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Quindi visualizzare gli stessi granulociti neutrofili CD15+ in un dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD157 PE, impostare gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione ancora del GPI- CD157- nel quadrante Q4 come illustrato nella Figura 16.

Figura 16 Granulociti neutrofili CD15+ in un dot-plot Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (ancora GPI) vs CD157 PE (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).
A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Calcolo e interpretazione dei risultati analitici

Quantificare la percentuale di cellule con carenza di GPI (con fenotipo EPN), vedere Tabella 5.

Tabella 5 Fenotipi del clone EPN

Popolazione di cellule parentali		Fenotipo EPN in base alla strategia di gating
Provetta PNH RBC 3-color	Eritrociti (tipo III)	CD59- CD235a+ (Fig. 5)
	Eritrociti (tipo II)	CD59 dim CD235a+ (Fig. 5)
	iRBCs (tipo III)	CD59- CD235a+ CD71+(Fig. 7)
	iRBCs (tipo III)	CD59 dim CD235a+ CD71+(Fig. 7)
Provetta PNH WBC 7-color	Monociti	CD14- CD157- CD64+ (Fig. 10)
		CD14- ancora GPI- CD64+ (Fig. 11)
		CD157- ancora GPI- CD64+ (Fig. 12)
	Granulociti neutrofili	CD24- CD157- CD15+ (Fig. 14)
		CD24- ancora GPI- CD15+ (Fig. 15)
		CD157- ancora GPI- CD15+ (Fig. 16)

Tabella 6 Interpretazione dei risultati

Limite di rivelabilità (cut-off) per le provette di WBC e RBC riportato come frequenza di cellule parentali (%), calcolata a partire da 100 misurazioni di n=25 campioni di pazienti in condizioni di salute normali su n=4 piattaforme di citometria a flusso diverse				
Fenotipo EPN	Citometro			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
Provetta PNH RBC 3-color				
RBC di tipo II e tipo III CD59-	0,005	0,002	0,029	0,049
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	0,240	0,320	0,388	0,562
Provetta PNH WBC 7-color				
Monociti CD157- CD14-	0,20	0,19	0,14	0,30
Monociti ancora GPI- CD14-	0,08	0,04	0,10	0,17
Monociti ancora GPI- CD157-	0,07	0,06	0,04	0,03
Granulociti neutrofili CD157- CD24-	0,02	0,02	0,06	0,03
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD24-	0,03	0,03	0,02	0,02
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD157-	0,01	0,01	0,01	0,01

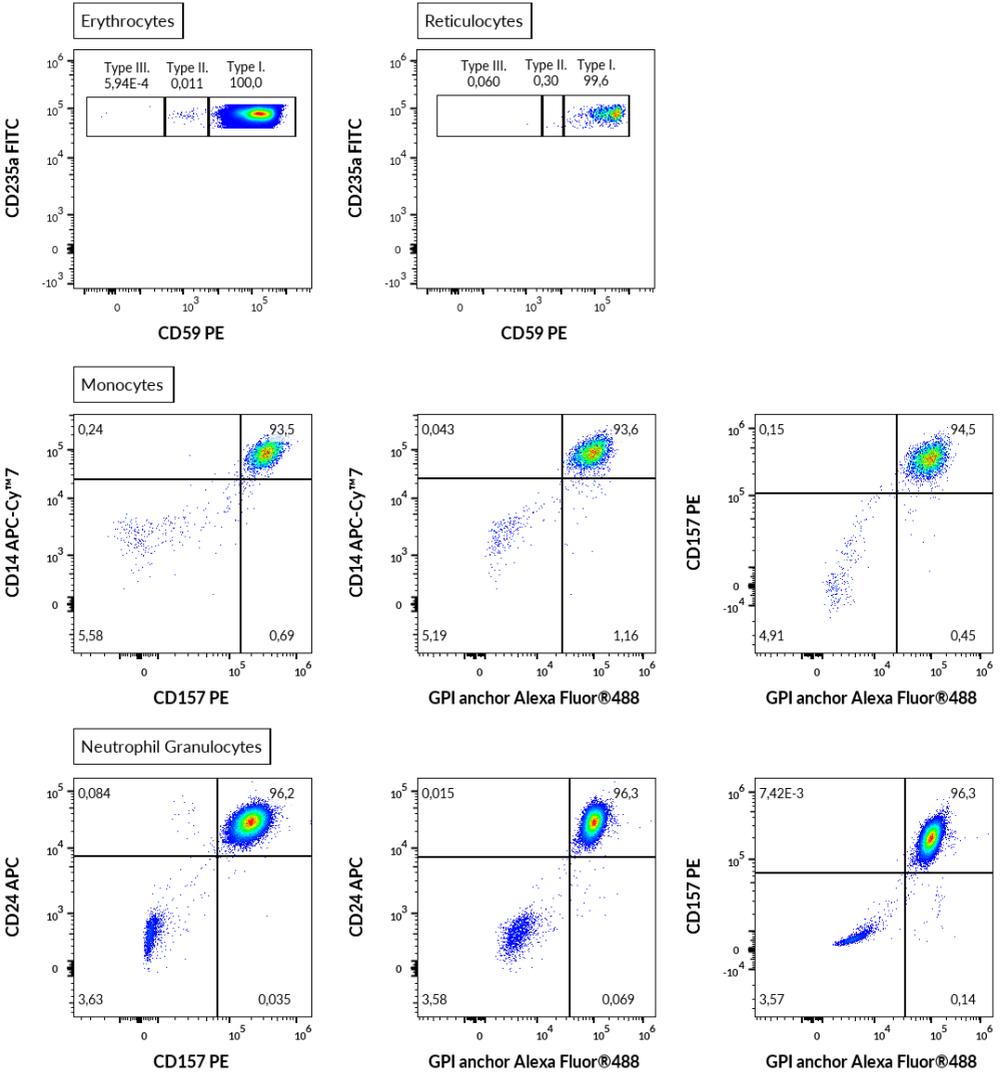
Regole dell'algoritmo per la segnalazione della carenza di GPI

1. In pazienti che presentano una popolazione di cellule con carenza di GPI con frequenza **inferiore** al valore di cut-off (Tabella 6), i risultati devono essere riferiti come segue: **“granulociti, monociti, eritrociti e iRBCs presentano un'espressione normale di antigeni GPI-linked. Non sono stati individuati cloni EPN”**⁽¹⁾.
2. In pazienti che presentano una popolazione di cellule con carenza di GPI con frequenza **superiore** al valore di cut-off (Tabella 6), i risultati devono essere riferiti come segue: **“granulociti, monociti, eritrociti o iRBCs presentano una carenza di GPI parziale o totale. Sono stati individuati cloni EPN.”**

ATTENZIONE: il laboratorio clinico deve stabilire il proprio limite di rivelabilità (LOD)/valori di cut-off da un gruppo di campioni di pazienti normali quando utilizza un citometro di tipo e/o di marca diversa rispetto a quanto specificato nelle Tabelle dalla 8 alla 11 (consultare la sezione 11. Prestazioni analitiche / Limite di rivelabilità / Cut-off del saggio).

3. Nella maggior parte dei casi di EPN, tutte le popolazioni di cellule target WBC presentano il clone EPN ^(4, 6, 7, 8). I cloni EPN nelle WBC hanno l'aspetto di cluster e sono meno sparpagliati rispetto agli eventi negativi doppi casuali.
4. In alcuni casi, è possibile individuare la presenza di un clone EPN nella provetta WBC, mentre non viene rilevata in una provetta RBC, come mostrato nella **Fig. 17**. In questo caso, la presenza di un clone EPN deve essere riferita in base alla **regola 2 dell'algoritmo di segnalazione della carenza di GPI**.
5. Se si rileva un clone EPN, riferire sempre la percentuale di tutti i fenotipi di cloni EPN (Tabella 6) della popolazione di cellule parentali. È possibile che i monociti presentino una dimensione del clone EPN più grande rispetto ai granulociti neutrofili ⁽²⁾.
6. La carenza di GPI (presenza di clone PNH) dovrebbe essere espressa in tutti i fenotipi PNH all'interno di un determinato sottogruppo di leucociti. Tutti i fenotipi di monociti PNH (Tabella 5) dovrebbero colorare in modo simile le cellule con deficit di GPI ⁽⁶⁾. Lo stesso vale per i fenotipi PNH neutrofili.

Figure 17 Esempio di un caso con presenza di un clone EPN in una provetta WBC, non rilevata invece in una provetta RBC (dati acquisiti su Beckman Coulter DxFLEx).



11. Prestazione analitiche

Specificità

Proaerolysin Alexa Fluor® 488 è una variante coniugata con fluorescenza di aerolisina batterica che si lega nello specifico alle ancore GPI delle proteine di superficie della membrana delle cellule umane ^(1, 2, 5, 8).

L'anticorpo SY11B5 riconosce un epitopo extracellulare sull'antigene CD157 dell'antigene CD157 espresso principalmente su monociti e granulociti. La specificità dell'anticorpo è stata confermata dall'HCDM Council (X workshop HLDA).

L'anticorpo 2D1 riconosce tutte le isoforme leucocitarie di CD45 umano (antigene comune leucocitario). La specificità dell'anticorpo è stata confermata dall'HCDM Council (III workshop HLDA).

L'anticorpo 10.1 riconosce l'antigene CD64 umano, espresso sui monociti. La specificità dell'anticorpo è stata confermata dal workshop HLDA (III workshop HLDA: WS Code T M-250).

L'anticorpo SN3 reagisce con l'antigene CD24, espresso dai granulociti. La specificità dell'anticorpo è stata confermata dal workshop HLDA (IV workshop HLDA: WS Code B 136; V HLDA: WS Code BP CD24.7)

L'anticorpo MEM-15 reagisce con CD14, una glicoproteina di membrana GPI-linked (glicosilfosfatidilinositolo) espressa sui monociti. La specificità dell'anticorpo è stata confermata dall'HCDM Council (III workshop HLDA: WS Code M 252; IV HLDA: WS Code M 113; IV HLDA: WS Code NL 90; IV HLDA: WS Code T 53; V HLDA: WS Code M MA086; VI HLDA: WS Code M MA94).

L'anticorpo MEM-158 reagisce con CD15, espresso intensamente sulla superficie dei granulociti. La specificità dell'anticorpo è stata confermata dall'HCDM Council (VI workshop HLDA: WS Code AS A053).

L'anticorpo JC159 riconosce un epitopo della porzione extracellulare di CD235a (glicoforina A), una sialoglicoproteina espressa su eritroblasti precoci, eritroblasti tardivi, eritroblasti ed eritrociti maturi.

L'anticorpo MEM-43 reagisce con un epitopo ben definito su CD59 (protectina), una glicoproteina GPI-linked espressa sulla superficie di tutte le cellule ematopoietiche. La specificità dell'anticorpo è stata confermata dal workshop HLDA (IV workshop HLDA: WS Code NL 705; V HLDA: WS Code AS S013; HLDA V: WS Code BP BP345; HLDA V: WS Code T T-103).

L'anticorpo MEM-75 reagisce con un epitopo extracellulare dell'antigene CD71 espresso su iRBCs immaturi. La specificità dell'anticorpo è stata confermata dal workshop HLDA (IV workshop HLDA: WS Code A 45; V HLDA: WS Code T T-165).

Accuratezza

L'accuratezza del metodo è stata determinata confrontando il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit con un metodo interno di un laboratorio clinico accreditato tramite la colorazione in parallelo di campioni di 13 pazienti con presenza confermata del fenotipo EPN. I parametri dell'analisi di regressione lineare sono presentati nella Tabella 7.

Tabella 7 Analisi di regressione lineare delle conte relative di popolazioni cellulari con carenza di GPI (fenotipi EPN) in pazienti con presenza confermata di fenotipi EPN (confronto del dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay kit con un metodo interno di un laboratorio clinico accreditato [un cocktail di anticorpi coniugati a un solo colore di diversi produttori e analizzato usando BD FACSCanto™ II])

Sottopopolazione di linfociti	n	Pendenza	Intercetta	R ²	Intervallo [%]
Eritrociti di tipo III CD59-CD235a+	13	0,99	-0,026	1,00	1,28 - 83,79
iRBCs di tipo III CD59-CD235a+	13	0,99	-0,384	1,00	5,97 - 97,78
Eritrociti di tipo II CD59-CD235a+	13	1,00	-0,059	1,00	0,13 - 89,92
iRBCs di tipo II CD59-CD235a+	13	0,98	0,141	1,00	0,33 - 74,67
Monociti CD157- ancora GPI- CD64+	13	1,00	0,060	1,00	2,07 - 99,95
Neutrofili CD157- ancora GPI- CD15+	13	0,99	0,294	1,00	0,80 - 99,82
Monociti CD14- ancora GPI- CD64+	13	Non determinato			2,04 - 99,96
Monociti CD14- CD157- CD64+	13	Non determinato			2,17 - 99,96
Neutrofili CD24- CD157- CD15+	13	Non determinato			0,80 - 99,83
Neutrofili CD24- ancora GPI- CD15+	13	Non determinato			0,81 - 99,80

n = numero di campioni ematici

Limite di rilevazione / Limite di quantificazione / Assay Cut-off

Il limite di rivelabilità (LOD) è stato determinato per ciascuna popolazione target (vedere Tabella 5) come valore medio dei risultati di 25 donatori sani di sangue aumentato aggiungendo tre deviazioni standard dalla media per 4 diverse piattaforme di citometria a flusso ed espresso come cut-off del saggio nelle Tabelle 8, 9, 10 e 11.

ATTENZIONE: il laboratorio clinico deve stabilire il proprio limite di rivelabilità (LOD)/valori di cut-off da un gruppo di campioni di pazienti normali quando utilizza un citometro di tipo e/o di marca diversa rispetto a quanto specificato nelle Tabelle dalla 8 alla 11.

Tabella 8 Valori di cut-off del dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo EPN, incidenza del fenotipo EPN e LOQ acquisiti con un citofluorimetro BD FACSLyric™.

Fenotipo EPN	BD FACSLyric™					
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	Cut-off (Media + 3*DS)	LOQ (Media + 10*DS)
Provetta RBC (1.000.000 di eventi acquisiti; min. 80% di eventi RBC singoli)						
RBC di tipo II e tipo III CD59-	25	0,003	0,001	5 – 48 eventi per 1.000.000 di eventi (media 25 eventi)	0,005 %	0,012 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,054	0,061	0 – 5 eventi per 3.000 iRBCs (media 2 eventi)	0,240 %	0,660 %
Provetta WBC (200.000 eventi acquisiti)						
Monociti CD157-CD14-	25	0,076	0,041	2 – 24 eventi per 10.000 monociti (media 8 eventi)	0,20 %	0,49 %
Monociti ancora GPI-CD14-	25	0,021	0,018	0 – 5 eventi per 10.000 monociti (media 2 eventi)	0,08 %	0,20 %
Monociti ancora GPI-CD157-	25	0,014	0,020	0 – 4 eventi per 10.000 monociti (media 1 evento)	0,07 %	0,21 %
Granulociti neutrofili CD157- CD24-	25	0,006	0,006	0 – 20 eventi per 100.000 neutrofili (media 5 eventi)	0,02 %	0,07 %

Granulociti neutrofili ancora GPI- CD24-	25	0,006	0,008	0 - 29 eventi per 100.000 neutrofili (media 6 eventi)	0,03 %	0,09 %
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD157-	25	0,002	0,002	0 - 8 eventi per 100.000 neutrofili (media 2 eventi)	0,01 %	0,02 %

Tabella 9 Valori di cut-off del dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo EPN, incidenza del fenotipo EPN e LOQ acquisiti con un citofluorimetro BD FACSCanto™ II.

Fenotipo EPN	BD FACSCanto™ II					
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	Cut-off (Media + 3*DS)	LOQ (Media + 10*DS)
Provetta RBC (1.000.000 di eventi acquisiti; min. 80% di eventi RBC singoletti)						
RBC di tipo II e tipo III CD59-	25	0,0006	0,0004	1 - 12 eventi per 1.000.000 di eventi (media 6 eventi)	0,002 %	0,004 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,0657	0,0847	0 - 5 eventi per 1.000 iRBCs (media 1 evento)	0,320 %	0,913 %
Provetta WBC (200.000 eventi acquisiti)						
Monociti CD157- CD14-	25	0,085	0,035	2 - 16 eventi per 10.000 monociti (media 8 eventi)	0,19 %	0,43 %
Monociti ancora GPI- CD14-	25	0,086	0,096	0 - 3 eventi per 10.000 monociti (media 1 evento)	0,04 %	0,10 %
Monociti ancora GPI- CD157-	25	0,084	0,019	0 - 7 eventi per 10.000 monociti (media 1 evento)	0,06 %	0,20 %
CD157- CD24- Granulociti neutrofili	25	0,004	0,052	0 - 17 eventi per 100.000 neutrofili (media 5 eventi)	0,02 %	0,06 %
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD24-	25	0,006	0,010	0 - 32 eventi per 100.000 neutrofili (media 6 eventi)	0,03 %	0,10 %

Granulociti neutrofili ancora GPI- CD157-	25	0,002	0,002	0 - 8 eventi per 100.000 neutrofili (media 2 eventi)	0,01 %	0,02 %
---	----	-------	-------	--	---------------	---------------

Tabella 10 Valori di cut-off del dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo EPN, incidenza del fenotipo EPN e LOQ acquisiti con un citofluorimetro Beckman Coulter Navios EX.

Fenotipo EPN	Beckman Coulter Navios EX					
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	Cut-off (Media + 3*DS)	LOQ (Media + 10*DS)
Provetta RBC (1.000.000 di eventi acquisiti; min. 80% di eventi RBC singoletti)						
RBC di tipo II e tipo III CD59-	25	0,007	0,007	4 - 236 eventi per 1.000.000 di eventi (media 60 eventi)	0,029 %	0,081 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,087	0,100	0 - 6 eventi per 1.000 iRBCs (media 1 evento)	0,388 %	1,092 %
Provetta WBC (200.000 eventi acquisiti)						
Monociti CD157- CD14-	25	0,062	0,027	0 - 23 eventi per 10.000 monociti (media 6 eventi)	0,14 %	0,33 %
Monociti ancora GPI- CD14-	25	0,024	0,006	0 - 10 eventi per 10.000 monociti (media 2 eventi)	0,10 %	0,28 %
Monociti ancora GPI- CD157-	25	0,007	0,011	0 - 6 eventi per 10.000 monociti (media 1 evento)	0,04 %	0,12 %
Granulociti neutrofili CD157- CD24-	25	0,012	0,015	0 - 43 eventi per 100.000 neutrofili (media 12 eventi)	0,06 %	0,16 %
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD24-	25	0,005	0,005	0 - 13 eventi per 100.000 neutrofili (media 5 eventi)	0,02 %	0,05 %
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD157-	25	0,002	0,002	0 - 10 eventi per 100.000 neutrofili (media 2 eventi)	0,01 %	0,03 %

Tabella 11 Valori di cut-off del dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo EPN, incidenza del fenotipo EPN e LOQ acquisiti con un citofluorimetro Beckman Coulter DxFLEx.

Fenotipo EPN	Beckman Coulter DxFLEx					
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	Cut-off (Media + 3*DS)	LOQ (Media + 10*DS)
Provetta RBC (1.000.000 di eventi acquisiti; min. 80% di eventi RBC singoli)						
RBC di tipo II e tipo III CD59-	25	0,015	0,012	5 – 48 eventi per 1.000.000 di eventi (media 25 eventi)	0,049 %	0,129 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,106	0,152	0 – 5 eventi per 1.000 iRBCs (media 2 eventi)	0,562 %	1,626 %
Provetta WBC (200.000 eventi acquisiti)						
Monociti CD157- CD14-	25	0,092	0,068	0 – 27 eventi per 10.000 monociti (media 10 eventi)	0,30 %	0,77 %
Monociti ancora GPI- CD14-	25	0,053	0,040	0 – 16 eventi per 10.000 monociti (media 6 eventi)	0,17 %	0,46 %
Monociti ancora GPI- CD157-	25	0,005	0,009	0 – 1 eventi per 10.000 monociti (media 1 evento)	0,03 %	0,10 %
Granulociti neutrofili CD157- CD24-	25	0,010	0,008	0 – 28 eventi per 100.000 neutrofili (media 10 eventi)	0,03 %	0,09 %
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD24-	25	0,008	0,006	0 – 20 eventi per 100.000 neutrofili (media 8 eventi)	0,02 %	0,06 %
Granulociti neutrofili ancora GPI- CD157-	25	0,002	0,002	0 – 5 eventi per 100.000 neutrofili (media 2 eventi)	0,01 %	0,02 %

NOTA: Per l'analisi della citometria a flusso sono stati utilizzati i seguenti citometri a flusso, inclusa la versione del software:

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

Per la valutazione dei dati misurati è stata utilizzata la seguente piattaforma di analisi:

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

12. Prestazione cliniche

Pazienti con carenza di GPI

I dati clinici sono stati raccolti in un centro clinico da 19 pazienti, sia sani ⁽⁶⁾ sia con carenza di GPI confermata ⁽¹³⁾. Le prestazioni cliniche sono state stabilite confrontando il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit con un metodo interno di un laboratorio clinico accreditato (un cocktail di anticorpi coniugati a un solo colore di produttori diversi e analizzati usando BD FACSCanto™ II).

La carenza di GPI in pazienti è stata valutata con riferimento al metodo utilizzato (Tabella 12) attraverso il rilevamento delle cellule con carenza di GPI (cloni EPN).

Tabella 12 Prestazioni cliniche del dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Valutazione della carenza di GPI utilizzando un metodo interno di un laboratorio clinico accreditato	
		Carenza di GPI	Condizione nella norma
Valutazione della carenza di GPI utilizzando il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Carenza di GPI	13 pazienti	0 pazienti
	Condizione nella norma	0 pazienti	6 pazienti

13.Valori previsti

Intervallo di riferimento

Nella popolazione normale non viene rilevata alcuna carenza di GPI e tutti i valori percentuali del fenotipo PNH dovrebbero essere inferiori al Assay Cut-off (LOD) ⁽⁶⁾.

14.Limitazioni

Non sono state individuate limitazioni d'uso in tipi specifici di malattie, come le anemie.

La segnalazione di carenza di GPI è limitata in base alle linee guida attuali più recenti pubblicate ⁽⁶⁾.

15.Riferimenti bibliografici

- 1) Borowitz, MJ et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):211-30. doi: 10.1002/cyto.b.20525.
- 2) Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2012; 82B: 195–208.
- 3) Marinov I, Illingworth AJ, Benko M, Sutherland DR. Performance Characteristics of a Non-Fluorescent Aerolysin-Based Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) Assay for Simultaneous Evaluation of PNH Neutrophils and PNH Monocytes by Flow Cytometry, Following Published PNH Guidelines. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Mar;94(2):257-263. doi: 10.1002/cyto.b.21389. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27294344.
- 4) Dezern, AE and Borowitz, MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 – clinical utility. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 16– 22.
- 5) Sutherland, DR, Illingworth, A, Marinov, I, Ortiz, F, Andreasen, J, Payne, D, Wallace, PK and Keeney, M. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 – reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 23–48.
- 6) Illingworth, A, Marinov, I, Sutherland, DR, Wagner-Ballon, O and DelVecchio, L. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 49–66.
- 7) Sutherland DR, Richards SJ, Ortiz F, Nayyar R, Benko M, Marinov I, Illingworth A. CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal

- immature RBCs in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Mar;98(2):179-192. doi: 10.1002/cyto.b.21853. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31705743.
- 8) Sutherland DR, Ortiz F, Quest G, Illingworth A, Benko M, Nayyar R, Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jul;94(4):637-651. doi: 10.1002/cyto.b.21626. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29381839.
 - 9) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
 - 10) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
 - 11) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: *Clin Chem* 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
 - 12) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.
 - 13) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x
 - 14) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.
 - 15) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem.* 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
 - 16) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
 - 17) Hervé Lecoeur, Marie-Lise Gougeon, Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes, *Journal of Immunological*

Methods, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759,
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).

- 18) Bartels EM, Falbe Wätjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis*. 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
- 19) XUE Yan, XU Li, DANG Liheng, WANG Chao, CUI Yaqiong, WANG Ping, WANG Ning, ZHANG Xinjie, LIU Yang. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2022, 37(12): 1169-1173
- 20) van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, et al. (2012) Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE* 7(2): e31496.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>
- 21) Yasmine Van Caeneghem, Stijn De Munter, Paola Tieppo, Glenn Goetgeluk, Karin Weening, Greet Verstichel, Sarah Bonte, Tom Taghon, Georges Leclercq, Tessa Kerre, Reno Debets, David Vermijlen, Hinrich Abken & Bart Vandekerckhove (2017) Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities, *Oncolmunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460
- 22) Lamia Achour, Mark G. H. Scott, Hamasseh Shirvani, Alain Thuret, Georges Bismuth, Catherine Labbé-Jullié, Stefano Marullo; CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009; 113 (9): 1938–1947. doi:
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141275>
- 23) A. Stronkhorst, G. N. J. Tytgat & S. J. H. Van Deventer (1992) CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27:sup194, 61-65, DOI: 10.3109/00365529209096029
- 24) Zinzani, P.L., Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 177–190 (2022).
<https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>
- 25) Whiteman KR, Johnson HA, Mayo MF, Audette CA, Carrigan CN, LaBelle A, Zukerberg L, Lambert JM, Lutz RJ. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small cell lung cancer in human xenograft models. *MAbs*. 2014 Mar-Apr;6(2):556-

66. doi: 10.4161/mabs.27756. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24492307; PMCID: PMC3984343.

- 26) J Frengen, B Kierulf, R Schmid, T Lindmo, K Nustad, Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, *Clinical Chemistry*, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>
- 27) Urbina, A. and Palomino, F. (2013), Reticulocyte count in red-blood-cell units stored in AS-1. *Vox Sang*, 104: 331-336. <https://doi.org/10.1111/vox.12011>
- 28) Ware RE, Rosse WF, Hall SE; Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 86 (4): 1586–1589. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V86.4.1586.bloodjournal8641586>

16. Sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni

La sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni sarà disponibile nel database Eudamed all'indirizzo <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Fino ad allora, la sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni è disponibile su richiesta.

17. Uso di marchi di terzi

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™ e BD Multitest™ sono marchi registrati di Becton, Dickinson and Company, Cy™ è un marchio registrato di Cytiva. VenturiOne® è marchio registrato di Applied Cytometry, Infinicyt™ è marchio registrato di Cytognos S.L.. SPHERO™ COMPtrol è un marchio registrato di Spherotech, Inc..

18. Cronologia delle revisioni

Versione 2, ED7750_IFU_v2

- 1) Aggiunta di interferenze endogene ed esogene.
- 2) È stata aggiornata la sezione "Regole dell'algoritmo di segnalazione delle carenze di GPI".
- 3) Sezione 13. Valori attesi - correzioni di testo minori.
- 4) Riferimenti aggiornati.
- 5) Aggiunta del numero ID dell'organismo notificato.
- 6) Aggiunta del nuovo numero del capitolo 16. Sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni.

19. Produttore

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

Contatti

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

20. Rappresentanti autorizzati

Svizzera Persona responsabile

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

NOTA: qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al produttore e all'autorità locale competente.