

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

25 test | N. Cat. **ED7750**

IVD **CE** ₂₂₆₅

Istruzioni per l'uso (IT)

Versione: ED7750_IFU_v4_IT
Data di pubblicazione: 13-03-2026

Simboli utilizzati nell'etichettatura del dispositivo

IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Tenere lontano dalla luce del sole
CE ₂₂₆₅	Marcatura CE di dichiarazione di conformità Numero identificativo dell'organismo notificato		Tenere all'asciutto Conservare al riparo dall'umidità
	Produttore		Precauzioni
UDI	Codice Unico di Identificazione		Non riutilizzare
	Consultare le istruzioni per l'uso	TUBE	Contiene <n> provette per test monouso
	Contenuto sufficiente per <n> test	CONC 10x	Soluzione concentrata (10x)
REF	Numero di catalogo	CONTENTS	Contenuti
LOT	Codice di lotto	UKCA	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 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 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. CMIgP-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: Lysing Solution (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	H302: Nocivo se ingerito. H315: Provoca irritazione cutanea. H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H319: Provoca grave irritazione oculare. H331: Tossico se inalato. 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. EUH071: Corrosivo per le vie respiratorie.
Frase P	P201: Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. P260: Non respirare i vapori. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P308+P313: IN CASO di esposizione o di possibile

esposizione, consultare un medico. P403+P233: Conservare in luogo ben ventilato. Tenere il recipiente ben chiuso.

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) ⁽¹⁾.

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

Processare il campione di sangue entro 48 ore dal prelievo. Se l'analisi viene eseguita entro 24 ore, conservare il campione a temperatura di laboratorio (20-25 °C). Se l'analisi viene posticipata oltre 24 ore ma entro 48 ore, refrigerare il campione⁽¹⁾.

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, 11
Bilirubina (ittero) (non coniugata)	La bilirubina aumenta il fondo di fluorescenza delle cellule a causa della sua elevata autofluorescenza.	12, 13, 14
Detriti cellulari (dopo la lisi)	I detriti cellulari possono fornire un conteggio impreciso delle cellule e impoverire gli anticorpi all'interno del dispositivo.	15, 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.	18
Anticorpi umani anti-murini	Può influire sulla funzionalità del dispositivo (capacità di legarsi agli antigeni della superficie cellulare).	19
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).	20
Trigliceridi	Elevati livelli circolanti di lipidi possono influenzare l'analisi in citometria a flusso di alcune popolazioni di cellule ematiche.	21

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 ⁽²²⁾. 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 ⁽²³⁾. 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 soprannatante 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 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 6-10 volte 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 microsfere 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.

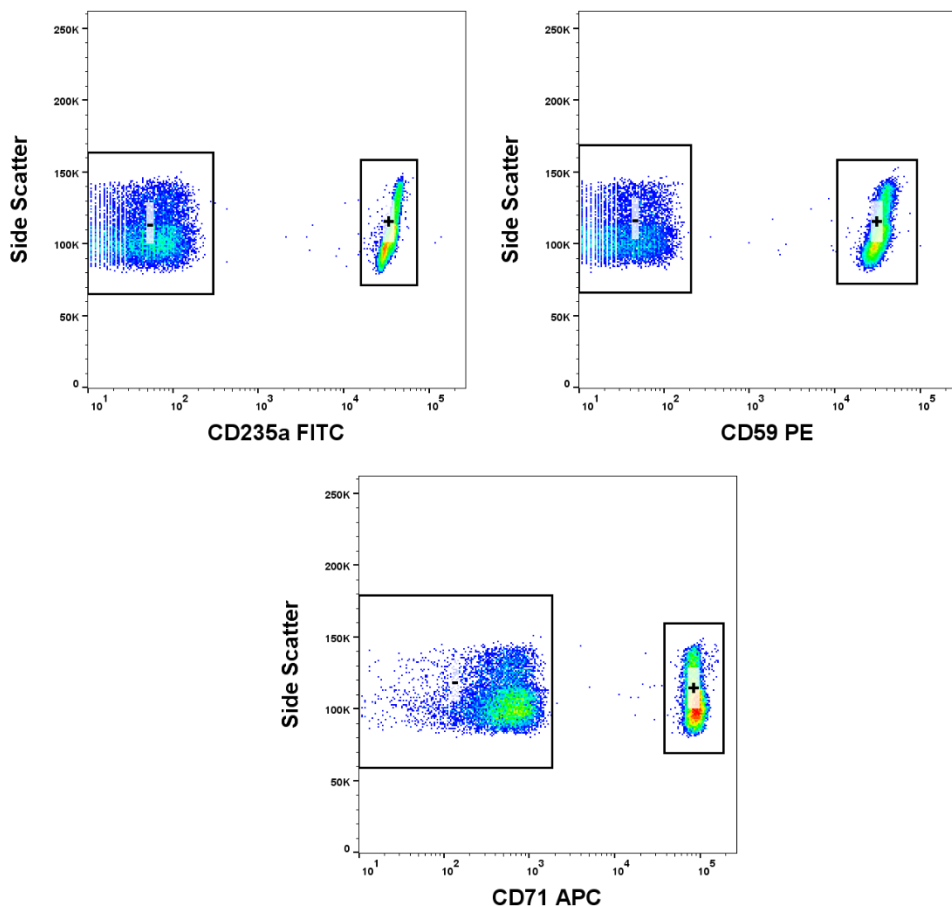
Per i laser e i rilevatori di fluorescenza fare riferimento alle specifiche tecniche del citometro fornite dal produttore, in base alle caratteristiche di eccitazione ed emissione dei fluorocromi indicate nella Sezione 6 Attrezzatura necessaria.

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.

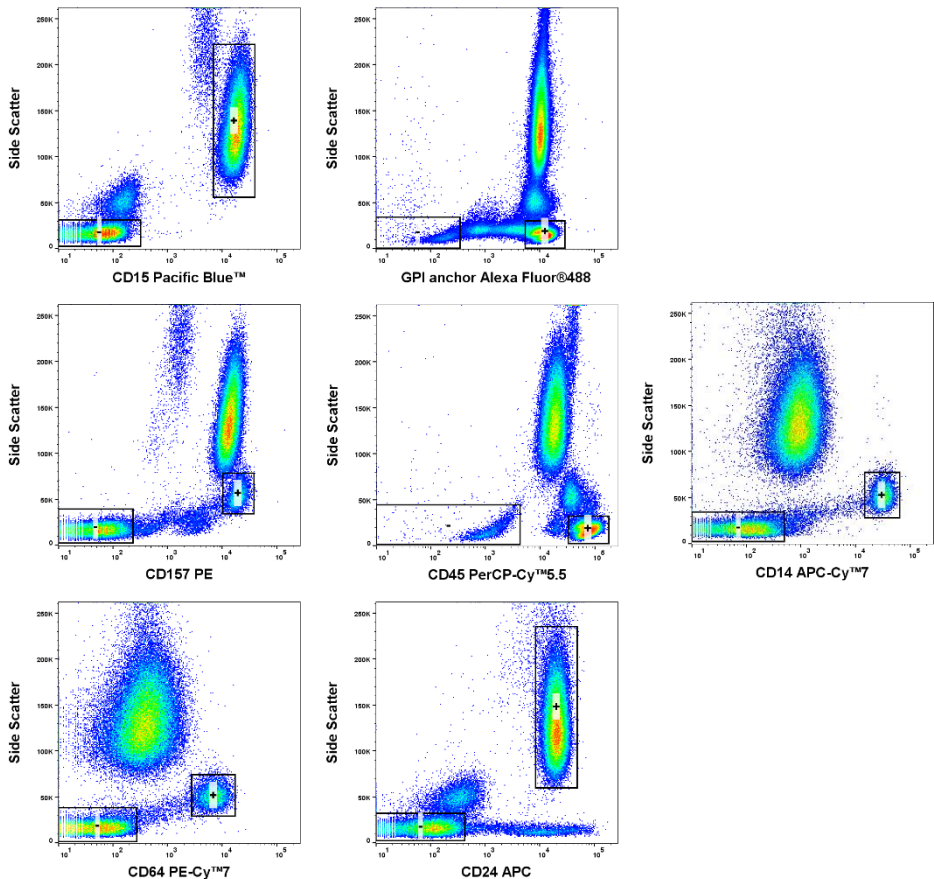
Figura 1 Identificazione di particelle di compensazione di citometria positive (+) e negative (-) nelle provette di compensazione (dati acquisiti su BD FACSCanto™ II).



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 della bassa conta di iRBC nel campione diluito, acquisire un minimo di 500.000 eventi eritrocitari per l'analisi. 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 Controllare tutti gli eventi acquisiti in un dot plot Tempo vs CD235a FITC (dati acquisiti su BD FACSLytic™).

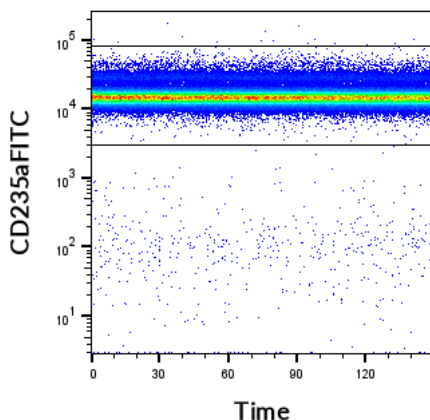
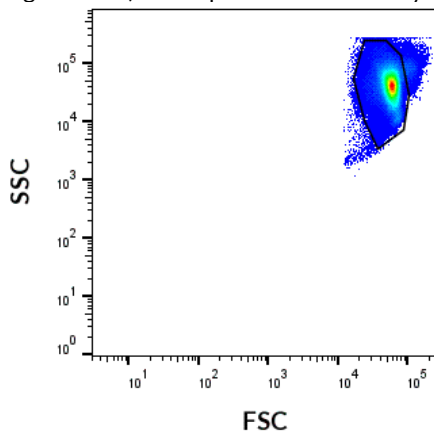
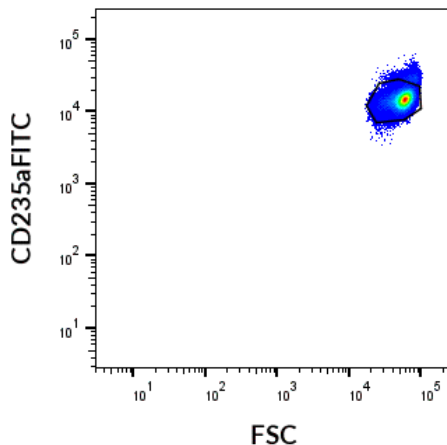


Figura 3a Visualizzare tutti gli eventi del gate Tempo in un dot plot FSC-A vs SSC-A in scala logaritmica (dati acquisiti su BD FACSLytic™).



Visualizzare i dati compensati del gate SSC vs FSC in un dot plot in scala logaritmica, dove l'asse X rappresenta FSC e l'asse Y rappresenta l'intensità di fluorescenza nel canale FITC. Impostare il gate "RBC singoli CD235a+" (Figura 4).

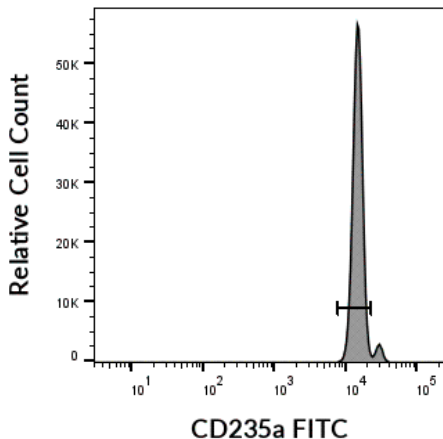
Figura 4 Delineazione degli RBC singoli CD235a+ (dati acquisiti su BD FACSLytic™).



Facoltativo:

Per una migliore differenziazione dei singoli è possibile visualizzare i dati compensati in istogramma, dove l'asse X rappresenta l'intensità di fluorescenza nel canale FITC. Impostare il gate "RBC singoli CD235a+" (Figura 4a).

Figura 4a Delineazione degli RBC singoli CD235a+ (dati acquisiti su BD FACSLytic™).



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 5a, 5b) e calcolare la percentuale di eventi nelle regioni di tipo I, tipo II e tipo III. In alcune situazioni, può risultare utile un istogramma per una migliore distinzione tra tipo II e tipo III.

Figura 5a Paziente con clone PNH: A) RBC singoli CD235a+ in un dot plot CD59 PE vs CD235a FITC; B) RBC singoli CD235a+ in un istogramma CD59 PE vs (dati acquisiti su BD FACSLytic™).

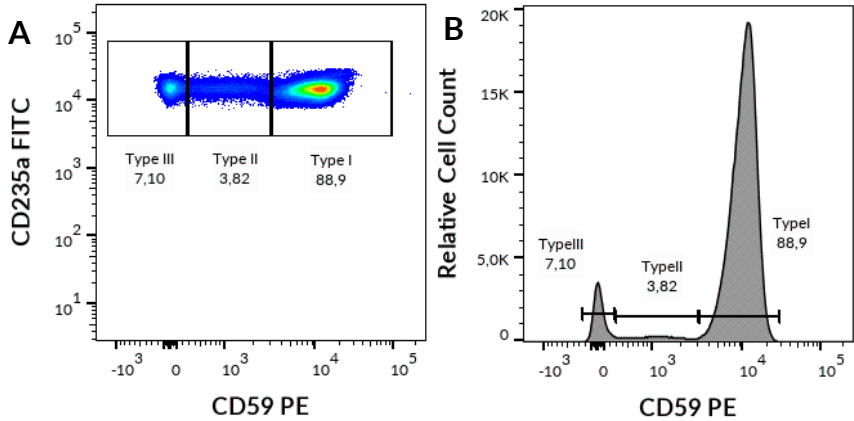
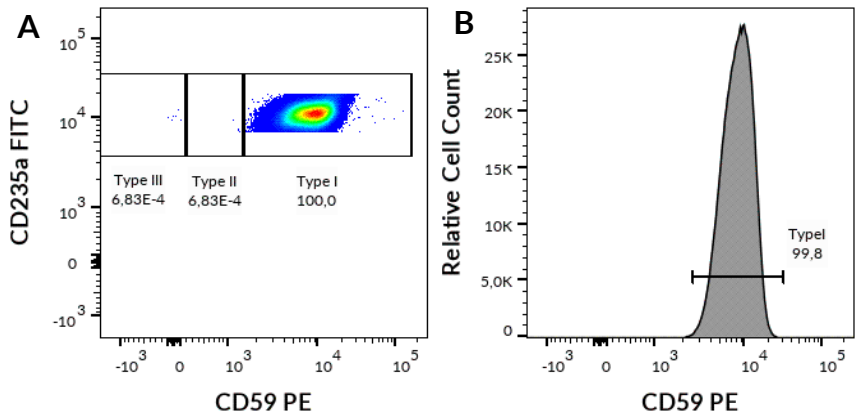


Figura 5b Donatore sano: A) RBC singoli CD235a+ in un dot plot CD59 PE vs CD235a FITC; B) RBC singoli CD235a+ in un istogramma CD59 PE vs (dati acquisiti su BD FACSLytic™).

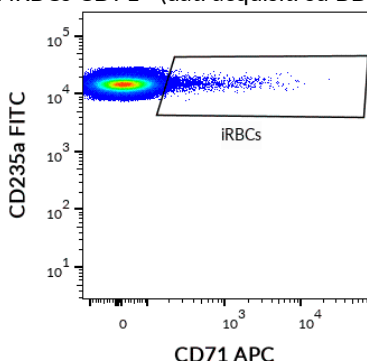


iRBCs (reticolociti immaturi)

Nei pazienti che ricevono trasfusioni di sangue, determinare la reale percentuale di RBC PNH di tipo II e tipo III. Gli RBC sani di un donatore di sangue che circolano nel flusso sanguigno di un paziente con PNH influiscono sulla percentuale accurata della dimensione del clone PNH. L'aggiunta di CD71 può risultare utile per escludere le cellule trasfuse dal donatore⁽⁶⁾.

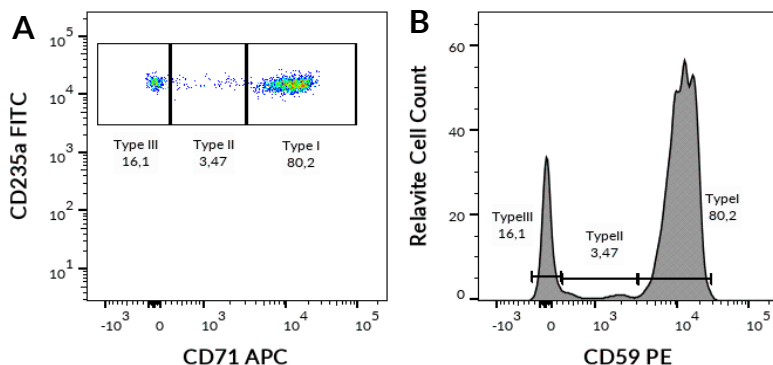
Visualizzare gli RBC singoli CD235a+ in un dot-plot CD71 APC vs CD235a FITC e separare gli iRBC CD71+ (Figura 6).

Figura 6 RBC singoli CD235a+ in un dot plot CD71 APC vs CD235a FITC. Delineazione di iRBCs CD71+ (dati acquisiti su BD FACSLytic™ II).



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

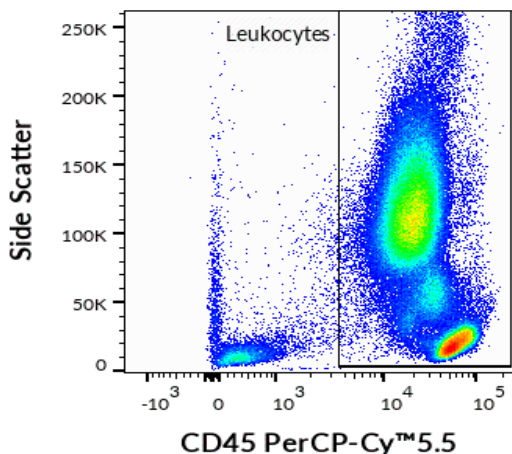
Figura 7 Paziente con clone PNH, ma senza trasfusione: A) iRBC singoli CD71+ in un dot plot CD59 PE vs CD235a FITC; B) iRBC singoli CD71+ in un istogramma CD59 PE vs (dati acquisiti su BD FACSLytic™).



Provetta PNH WBC 7-color (striscia ciano)

Acquisire almeno 50.000 neutrofili e 10.000 monociti, vale a dire che almeno 200.000 eventi saranno acquisiti per l'analisi. 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.

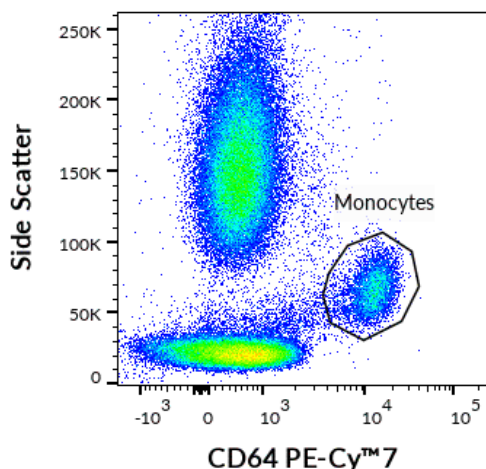
Figura 8 Delineazione di leucociti CD45+ (dati acquisiti su BD FACSLytic™ II).



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.

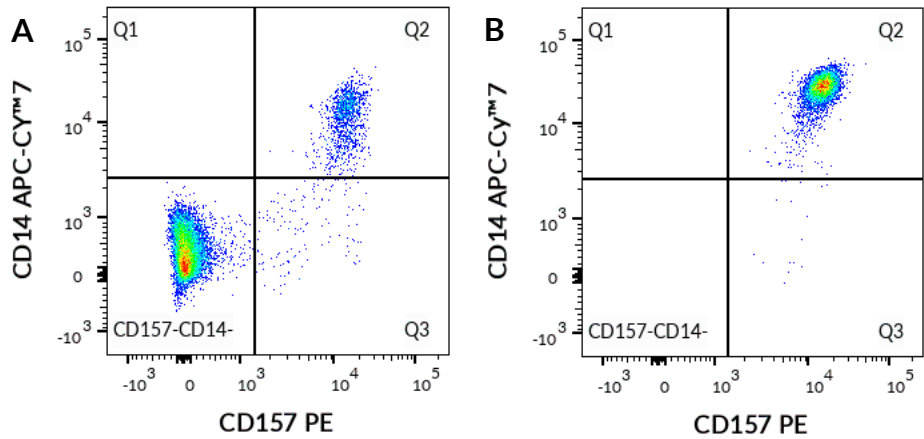
Figura 9 Delineazione di monociti CD64+ dai leucociti (dati acquisiti su BD FACSLytic™).



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-.

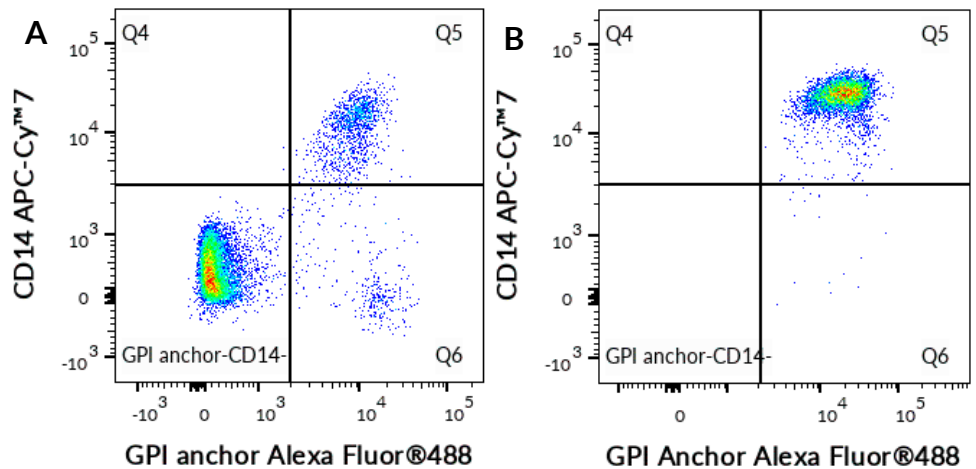
Figura 10 Monociti CD64+ in un dot plot CD157 PE vs CD14 APC-Cy™7 (dati acquisiti su BD FACSLytic™).

A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



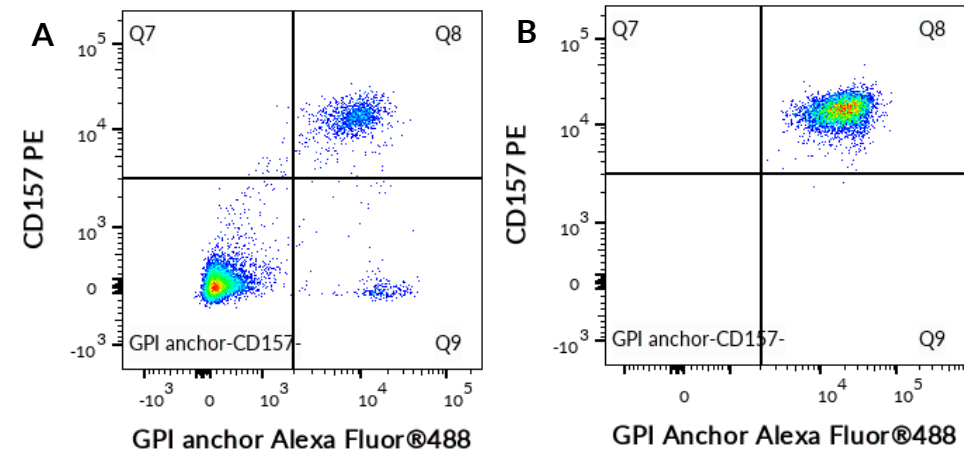
Quindi visualizzare gli stessi monociti CD64+ in un dot-plot con ancora GPI Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) vs CD14 APC-Cy™7 (Figura 11). Impostare gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione CD14- ancora GPI-.

Figura 11 Monociti CD64+ in un dot plot ancora GPI Alexa Fluor® 488 vs CD14 APC-Cy™7 (dati acquisiti su BD FACSLytic™). A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



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

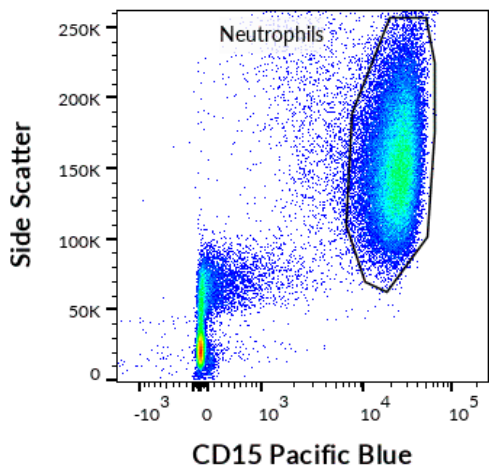
Figura 12 Monociti CD64+ in un dot plot ancora GPI Alexa Fluor® 488 vs CD157 PE (dati acquisiti su BD FACSLytic™). A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Neutrofili

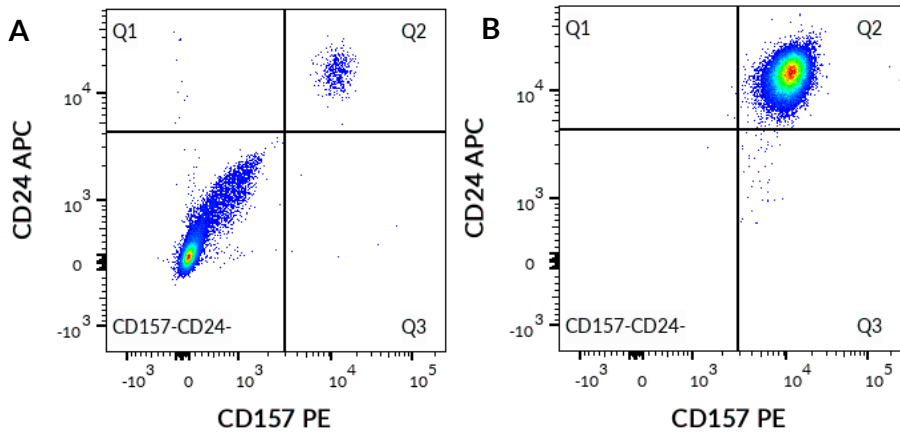
Visualizzare i leucociti CD45+ in un dot-plot side-scatter vs CD15 Pacific Blue™ e separare i neutrofili CD15+ come illustrato nella Figura 13.

Figura 13 Delineazione di neutrofili CD15+ dai leucociti (dati acquisiti su BD FACSLytic™).



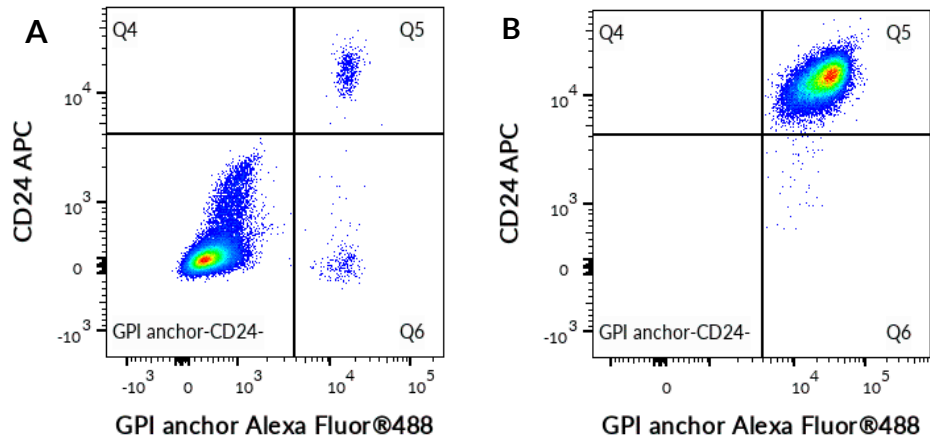
Visualizzare i neutrofili CD15+ in un dot-plot CD157 PE vs CD24 APC come illustrato nella Figura 14. Impostare gate appropriati e calcolare la percentuale di popolazione CD157-CD24-.

Figura 14 Neutrofili CD15+ in un dot-plot CD157 PE vs. CD24 APC (dati acquisiti su BD FACSLyric™). A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



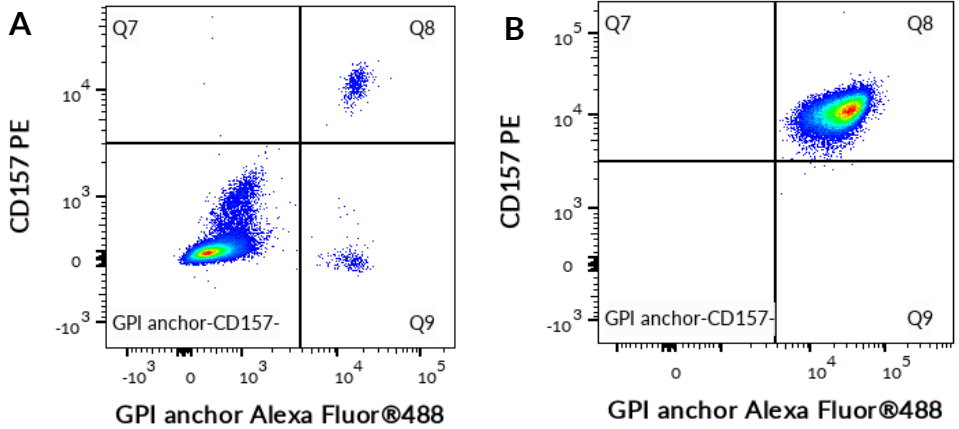
Quindi visualizzare gli stessi neutrofili CD15+ in un dot-plot con ancora Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) vs CD24 APC. Impostare gate adeguati e calcolare la percentuale di popolazione ancora GPI- CD24- come illustrato nella Figura 15.

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



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

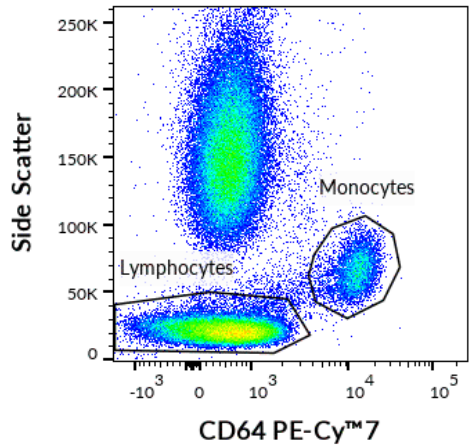
Figura 16 Neutrofili CD15+ in un dot-plot ancora GPI Alexa Fluor® 488 vs CD157 PE (dati acquisiti su BD FACSLytic™). A) paziente con clone EPN; B) donatore sano



Controllo interno

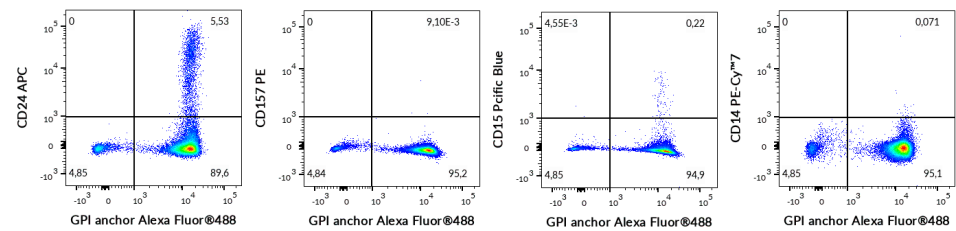
Per verificare la tensione del rivelatore di fluorescenza e la compensazione, è necessario analizzare il controllo interno (Figura 18). Nel dot plot CD64 PE-Cy™7 vs side scatter, selezionare i linfociti come popolazione per il controllo interno (Figura 17).

Figura 17 Delineazione dei linfociti CD64- dai leucociti (dati acquisiti su BD FACSLytic™).



Visualizzare quindi i linfociti in dot plot GPI anchor Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) vs CD24 APC/CD157 PE/CD15 Pacific Blue™/CD14 PE-Cy™7 per verificare le impostazioni di tensione, la compensazione e la prestazione anticorpale (Figura 18).

Figura 18 Controlli interni (dati acquisiti su BD FACSLyric™).



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)
	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 (LOD) 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
Neutrofili CD157- CD24-	0,02	0,02	0,06	0,03
Neutrofili ancora GPI- CD24-	0,03	0,03	0,02	0,02
Neutrofili ancora GPI- CD157-	0,01	0,01	0,01	0,01

Regole dell'algoritmo per la segnalazione della carenza di GPI⁽⁶⁾:

1. Segnalazione di un clone PNH nella provetta RBC

Popolazione cellulare	Frequenza	Dichiarazione e azione conseguenti ⁽⁶⁾
RBC di tipo II + tipo III CD59-	<LOD	"Non sono state rilevate cellule PNH" Rare cellule del fenotipo PNH registrate al di sotto del livello di rivelabilità
	>1%	"Clone PNH presente" È possibile segnalare la percentuale di cellule
	>LOD (Tabella 6) < 0.01 % ⁽⁶⁾	"Cellule PNH presenti" Rare cellule rare del fenotipo PNH registrate sotto il livello di quantificazione

2. Segnalazione di un clone PNH nella provetta WBC

Popolazione cellulare	Frequenza (%)	Dichiarazione e azione conseguenti ⁽⁶⁾
Ancora GPI- CD14- Monociti	<LOD	"Non sono state rilevate cellule PNH" Rare cellule del fenotipo PNH registrate al di sotto del livello di rivelabilità
	>1%	"Clone PNH presente" È possibile segnalare la percentuale di cellule
	>LOD (Tabella 6); <LLOQ (Tabella 13, 14)	"Cellule PNH presenti" È possibile segnalare la percentuale di cellule
Neutrofili ancora GPI- CD24-	<LOD	"Non sono state rilevate cellule PNH" Rare cellule del fenotipo PNH registrate al di sotto del livello di rivelabilità
	>1%	"Clone PNH presente" È possibile segnalare la percentuale di cellule
	>LOD (Tabella 6); <LLOQ (Tabella 13, 14)	"Cellule PNH presenti" È possibile segnalare la percentuale di cellule

3. Segnalazione della dimensione del clone PNH negli RBC.

Segnalazione delle dimensione totali del clone PNH nonché delle percentuali per la popolazione PNH di tipo II e tipo III, insieme alla conta della popolazione cellulare acquisita secondo la Tabella 7.

4. Segnalazione della dimensione del clone PNH nei WBC.

Segnalazione della dimensione del clone PNH sia nelle linee di neutrofili sia di monociti. I cloni PNH nei WBC hanno aspetto di cluster e sono meno sparpagliati rispetto agli eventi negativi doppi casuali. I monociti possono mostrare cloni PNH di dimensione maggiore rispetto ai neutrofili⁽²⁾. La carenza di GPI (presenza di clone

PNH) deve essere espressa in tutti i fenotipi PNH all'interno della specifica sottopopolazione leucocitaria. Tutti i fenotipi di monociti PNH (Tabella 5) devono colorare in modo simile le cellule con deficit di GPI⁽⁶⁾. Lo stesso vale per i fenotipi PNH neutrofili.

Terminologia di segnalazione del clone PNH (secondo CLSI H52-A2):

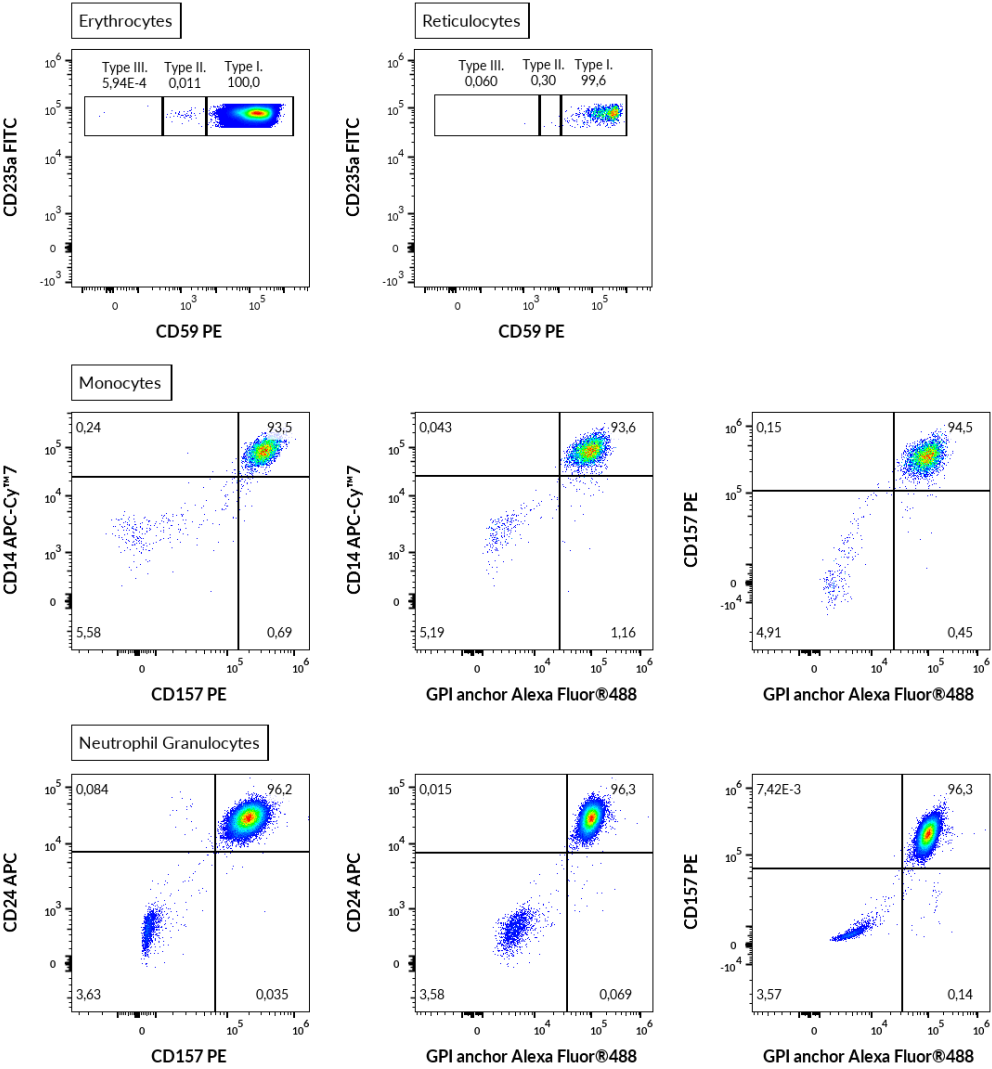
- a. Popolazione PNH >1%: "clone PNH"
- b. Popolazione PNH da 0,1% a 1%: "clone PNH minore"
- c. Popolazione PNH <0,1%: "rare cellule con fenotipo PNH"

Tabella 7 Esempi di possibili esiti dell'esame (non da un unico paziente) per un citoflourimetro BD FACLyric™.

Fenotipo PNH	Conta di eventi PNH	Conta di eventi della popolazione parentale	Frequenza	LLOQ	Valutazione
CD59- CD235a+ RBC	3 eventi	521.023 RBC singoletti	0,0006%	0,01 % ⁽⁶⁾	"Non sono state rilevate cellule PNH" Rare cellule del fenotipo PNH registrate al di sotto del livello di rivelabilità
CD24- ancora GPI- CD15+	69.851 eventi	75.849 neutrofili	92,1 %	0,088 % (Tabella 13)	"Rilevato clone PNH" Dimensione clone PNH 92,1% dei neutrofili
CD14- ancora GPI- CD64+	13 eventi	12.497 monociti	0,103 %	0,141 % (Tabella 13)	"Cellule PNH presenti; clone PNH minore" Dimensione clone PNH 0,103% dei monociti

5. Gli istogrammi e i dot plot possono essere inclusi nel referto, ma è facoltativo.

Figura 19 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 della proteina CD157 espressa 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 valutata confrontando il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit con il metodo interno di un laboratorio clinico accreditato (un cocktail di anticorpi coniugati a un solo colore di diversi produttori e analizzati con BD FACSCanto™ II) attraverso la colorazione in parallelo di 13 pazienti con presenza confermata del fenotipo PNH. I parametri dell'analisi di regressione lineare sono presentati nella Tabella 8.

Tabella 8 Analisi di regressione lineare delle conte relative di popolazioni cellulari con carenza di GPI in pazienti con presenza confermata di fenotipi PNH. Confronto tra il dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit analizzato usando BD FACSCanto™ II e un metodo interno di un laboratorio clinico accreditato.

Fenotipo PNH	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

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 (Tabelle 9, 10, 11 e 12).

Tabella 9 Valori LOD del DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo PNH acquisiti con un citofluorimetro BD FACSLytic™.

Fenotipo EPN	BD FACSLytic™				
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	LOD (Media + 3*DS)
Provetta RBC (1.000.000 di eventi acquisiti; min. 80% di eventi RBC singoletti)*					
RBC di tipo II e tipo III CD59-	25	0,003	0,001	5 – 48 eventi per 1.000.000 di eventi	0,005 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,054	0,061	0 – 5 eventi per 3.000 iRBCs	0,240 %
Provetta WBC (50.000 neutrofili e 10.000 monociti acquisiti)					
Monociti CD157-CD14-	25	0,076	0,041	2 – 24 eventi per 10.000 monociti	0,20 %
Monociti ancora GPI-CD14-	25	0,021	0,018	0 – 5 eventi per 10.000 monociti	0,08 %
Monociti ancora GPI-CD157-	25	0,014	0,020	0 – 4 eventi per 10.000 monociti	0,07 %
Neutrofili CD157-CD24-	25	0,006	0,006	0 – 10 eventi per 50.000 neutrofili	0,02 %
Neutrofili ancora GPI-CD24-	25	0,006	0,008	0 – 15 eventi per 50.000 neutrofili	0,03 %
Neutrofili ancora GPI-CD157-	25	0,002	0,002	0 – 4 eventi per 50.000 neutrofili	0,01 %

AVVISO*: si consiglia un minimo del 98% di frequenza di eventi singoletti per l'analisi in un cocktail di anticorpi liquidi ⁽²⁴⁾. Un cocktail di anticorpi secchi nel DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay consente solitamente una frequenza di eventi singoletti inferiore e il 98% di frequenza di eventi singoletti potrebbe non essere raggiunto.

Tabella 10 Valori LOD del DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo PNH acquisiti con un citofluorimetro BD FACSCanto™ II.

Fenotipo EPN	BD FACSCanto™ II				
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	LOD (Media + 3*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	0,002 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,0657	0,0847	0 – 5 eventi per 1.000 iRBCs	0,320 %
Provetta WBC (50.000 neutrofili e 10.000 monociti acquisiti)					
Monociti CD157-CD14-	25	0,085	0,035	2 – 16 eventi per 10.000 monociti	0,19 %
Monociti ancora GPI-CD14-	25	0,086	0,096	0 – 3 eventi per 10.000 monociti	0,04 %
Monociti ancora GPI-CD157-	25	0,084	0,019	0 – 7 eventi per 10.000 monociti	0,06 %
Neutrofili CD157-CD24-	25	0,004	0,052	0 – 8 eventi per 50.000 neutrofili	0,02 %
Neutrofili ancora GPI-CD24-	25	0,006	0,010	0 – 16 eventi per 50.000 neutrofili	0,03 %
Neutrofili ancora GPI-CD157-	25	0,002	0,002	0 – 4 eventi per 50.000 neutrofili	0,01 %

Tabella 11 Valori LOD del DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo PNH acquisiti con un citofluorimetro Beckman Coulter Navios EX.

Fenotipo EPN	Beckman Coulter Navios EX				
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	LOD (Media + 3*DS)
Provetta RBC (1.000.000 di eventi acquisiti; min. 80% di eventi RBC singoli)					
RBC di tipo II e tipo III CD59-	25	0,007	0,007	4 – 236 eventi per 1.000.000 di eventi	0,029 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,087	0,100	0 – 6 eventi per 1.000 iRBCs	0,388 %
Provetta WBC (50.000 neutrofili e 10.000 monociti acquisiti)					
Monociti CD157-CD14-	25	0,062	0,027	0 – 23 eventi per 10.000 monociti	0,14 %
Monociti ancora GPI-CD14-	25	0,024	0,006	0 – 10 eventi per 10.000 monociti	0,10 %
Monociti ancora GPI-CD157-	25	0,007	0,011	0 – 6 eventi per 10.000 monociti	0,04 %
Neutrofili CD157-CD24-	25	0,012	0,015	0 – 21 eventi per 50.000 neutrofili	0,06 %
Neutrofili ancora GPI-CD24-	25	0,005	0,005	0 – 6 eventi per 50.000 neutrofili	0,02 %
Neutrofili ancora GPI-CD157-	25	0,002	0,002	0 – 5 eventi per 50.000 neutrofili	0,01 %

Tabella 12 Valori LOD del DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit per ciascun fenotipo PNH acquisiti con un citofluorimetro Beckman Coulter DxFLEx.

Fenotipo EPN	Beckman Coulter DxFLEx				
	n	Media [%]	DS [%]	Incidenza del fenotipo EPN	LOD (Media + 3*DS)
Provetta RBC (1.000.000 di eventi acquisiti; min. 80% di eventi RBC singoletti)					
RBC di tipo II e tipo III CD59-	25	0,015	0,012	5 – 48 eventi per 1.000.000 di eventi	0,049 %
iRBCs di tipo II e tipo III CD59-	25	0,106	0,152	0 – 5 eventi per 1.000 iRBCs	0,562 %
Provetta WBC (50.000 neutrofili e 10.000 monociti acquisiti)					
Monociti CD157-CD14-	25	0,092	0,068	0 – 27 eventi per 10.000 monociti	0,30 %
Monociti ancora GPI-CD14-	25	0,053	0,040	0 – 16 eventi per 10.000 monociti	0,17 %
Monociti ancora GPI-CD157-	25	0,005	0,009	0 – 1 eventi per 10.000 monociti	0,03 %
Neutrofili CD157-CD24-	25	0,010	0,008	0 – 14 eventi per 50.000 neutrofili	0,03 %
Neutrofili ancora GPI-CD24-	25	0,008	0,006	0 – 10 eventi per 50.000 neutrofili	0,02 %
Neutrofili ancora GPI-CD157-	25	0,002	0,002	0 – 3 eventi per 50.000 neutrofili	0,01 %

Limite di quantificazione

Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è stato determinato mediante diluizioni seriali (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) di un campione PNH con un campione fresco di sangue normale e valutato mediante colorazione e analisi in triplicato, utilizzando i citofluorimetri BD FACSLytic™ e Beckman Coulter DxFlex. Un CV massimo del 10% è stato scelto come criterio di sensibilità per il LLOQ.

Tabella 13 Valori di frequenza LLOQ del DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit acquisiti con un citofluorimetro BD FACSLytic™.

Fenotipo PNH	Diluizione	Numero di cellule PNH	LLOQ	CV
RBC di tipo II e tipo III CD59-	1:10,000	101	0,029 %	3,9 %
Monociti CD157- CD14-	1:10,000	28	0,677 %	2,3 %
Monociti ancora GPI-CD14-	1:10,000	7	0,130 %	7,7 %
Monociti ancora GPI-CD157-	1:10,000	2	0,018 %	9,9 %
Neutrofili CD157-CD24-	1:10,000	3	0,012 %	3,6 %
Neutrofili ancora GPI-CD24-	1:10,000	1	0,009 %	8,7 %
Neutrofili ancora GPI-CD157-	1:10,000	1	0,010 %	1,2 %

Tabella 14 Valori di frequenza LLOQ di DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit acquisiti con un citofluorimetro Beckman Coulter DxFLEx.

Fenotipo PNH	Diluizione	Numero di cellule PNH	LLOQ	CV
RBC di tipo II e tipo III CD59-	1:10,000	101	0,005 %	9,1 %
Monociti CD157- CD14-	1:10,000	22	0,143 %	4,0 %
Monociti ancora GPI-CD14-	1:10,000	4	0,026 %	2,2 %
Monociti ancora GPI-CD157-	1:10,000	11	0,068 %	5,9 %
Neutrofili CD157- CD24-	1:10,000	29	0,024 %	4,2 %
Neutrofili ancora GPI-CD24-	1:10,000	8	0,007 %	7,1 %
Neutrofili ancora GPI-CD157-	1:10,000	9	0,007 %	8,5 %

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 15) attraverso il rilevamento delle cellule con carenza di GPI (cloni EPN).

Tabella 15 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⁾.

Il clone PNH non viene rilevato nei linfociti perché si verifica più frequentemente nei neutrofili e nei monociti rispetto ai linfociti maturi: ciò indica che le cellule linfoidi sono longeve e possono esistere prima della formazione o dell'espansione dei cloni PNH.

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 et al. 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. et al. Performance Characteristics of a Non-Fluorescent Aerolysin-Based Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) Assay for Simultaneous Evaluation of PNH Neutrophils and PNH Monocytes by Flow Cytometry, Following Published PNH Guidelines. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Mar;94(2):257-263. doi: 10.1002/cyto.b.21389.
- 4) Dezern, AE et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders, part 1 – clinical utility. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 16– 22.
- 5) Sutherland, DR et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders, part 2 – reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 23–48.
- 6) Illingworth, A et al. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 49– 66.
- 7) Sutherland DR, et al. CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal immature RBCs in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Mar;98(2):179-192. doi: 10.1002/cyto.b.21853.
- 8) Sutherland, DR et al. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018

Jul;94(4):637-651. doi: 10.1002/cyto.b.21626.

- 9) Tate, J. et al. 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.
- 11) Frengen, J. et al. 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>
- 12) Htun, NM 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
- 13) Haga Y, et al. 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.
- 14) XUE Yan, et al. 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
- 15) Higgins J, et al. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. Clin Vaccine Immunol. 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07.
- 16) Lam, Wing Kit et al. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. International journal of laboratory hematology vol. 44,6 (2022): 983-985. doi:10.1111/ijlh.13859.
- 17) Hervé Lecoœur, et al. 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) de Jonge G, et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. J Clin Lab Anal. 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396.
- 19) 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.
- 20) Bartels EM, et al. 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.

- 21) van Ierssel SH, et al. Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. PLOS ONE 2012 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>.
- 22) Urbina, A. et al. Reticulocyte count in red-blood-cell units stored in AS-1. Vox Sang, 2013 104: 331-336. <https://doi.org/10.1111/vox.12011>
- 23) Ware RE, et al. 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>.
- 24) Payne D, et al. Inter-Laboratory Validation of a Harmonized PNH Flow Cytometry Assay. Cytometry Part B 2018; 94B: 736–743. Doi: 0.1002/cyto.b.21726

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 FACSLytic™ e FlowJo™ 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 4, ED7750_IFU_v4

- 1) Il capitolo "Campione" è stato aggiornato.
- 2) Le precauzioni del capitolo 10 sono state aggiornate.
- 3) Le sezioni "Provetta PNH RBC 3-color" e "Provetta PNH WBC 7-color", comprese le figure del capitolo 10, sono state aggiornate.
- 4) La sezione "Controlli interni" del capitolo 10 è stata aggiunta.
- 5) La precauzione della sezione "Calcolo e interpretazione dei risultati analitici" è stata aggiunta.
- 6) La sezione "Regole dell'algoritmo per la segnalazione della carenza di GPI" è stata aggiornata.
- 7) La sezione 11 "Prestazioni analitiche" è stata aggiornata.

8) La sezione "Limitazioni" è stata aggiornata.

9) La numerazione degli articoli della sezione "Riferimenti bibliografici" è stata corretta.

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.