

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti

25 test | Kat. No. ED7750

IVD CE 2265

Kullanım Kılavuzu (TR)

Versiyon: ED7750_IFU_v4_TR

Yayın Tarihi: 13/03/2026

Cihaz etiketlemesinde kullanılan semboller

IVD	İn Vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz		Sıcaklık sınırı
CE 2265	CE uygunluk işareti Onaylanmış Kuruluş Kimlik Numarası		Güneş ışığından uzak tutun
	Üretici		Kuru Yerde Tutun Yağmurdan uzak tutun
UDI	Benzersiz Cihaz Tanımlayıcısı		Dikkat
	Kullanım talimatlarına bakın		Yeniden kullanmayın
	İçeriği <n> test için yeterlidir	TUBE	Tek kullanımlık test için <n> tüp içerir
REF	Katalog numarası	CONC 10x	Konsantre solüsyon (10 kat)
LOT	Parti kodu	CONTENTS	İçindekiler
	Son kullanma tarihi	UK CA	UKCA işareti

1. Kullanım Amacı

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti, akış sitometrisi ile insan tam kanında glikozil-fosfatidil-inositol (GPI) eksikliği olan hücrelerin yüksek hassasiyetle tespiti ve sayımı için tasarlanmıştır.

Tespit edilen ve/veya ölçülen nedir?

Kiti cihazı, glikozil-fosfatidil-inositol (GPI) eksikliği olan hücreleri (PNH klonları) aşağıdakilerin yüzdesi olarak tespit eder ve sayar:

- Tüm eritrositlerdeki CD59 düzeyi düşük veya CD59- hücreler (CD235a+)
- Tüm iBCdeki CD59 düzeyi düşük veya CD59- hücreler (CD235a+CD71+)
- Tüm monositlerdeki CD14-, CD157- ve GPI çapası- hücreleri (CD45+CD64+)
- Tüm nötrofillerden CD24-, CD157- ve GPI çapası- hücreleri (CD45+CD15+)

Cihazın işlevi

Cihaz, Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri (PNH) ve ilişkili bozuklukları olan veya olduğundan şüphelenilen hastaların teşhisi ve takibi için tasarlanmıştır ⁽¹⁾.

Fizyolojik veya patolojik durumun kapsamı

Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH), Fosfatidilinositol Glikan Çapa Biyosentezi Sınıf A (PIGA) geninin somatik mutasyonuna sahip hücrelerin kötü huylu olmayan klonal genişlemesinin sonucunda ortaya çıkan nadir bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. PIGA geninin mutasyonları, glikozil-fosfatidil-inositol (GPI) bağlı hücre yüzeyi proteinlerinin ortaya çıkamamasına neden olur.

Cihaz, PNH klon boyutunun değerlendirilmesi için GPI eksikliği olan nötrofiller ve monositler ⁽¹⁾ ile birlikte tam (Tip III) ve kısmi (Tip II) GPI eksikliği olan eritrositleri ^(2,3,4,5,6) tespit etmek üzere tasarlanmıştır.

Ayrıca cihaz, PNH eritrositlerinin tanımlanmasının zor olduğu durumlarda kan transfüzyonu yapılan hastalarda GPI eksikliği bulunan iRBC (olgunlaşmamış eritrositler) tespit etmektedir ⁽⁷⁾.

Test türü

Otomatik değil

Nicel

Gereken örnek türü

İnsan antikoagüle periferik tam kan örneği (EDTA, heparin, sitrat) ⁽¹⁾

Test popölasyonu

Aşağıdakilerin görüldüğü hastalar:

- hemolizin diğery yaygın nedenleri göz ardı edildiğinde hemolizin laboratuvar belirteçleri,
- genç yaşlarda sebebi açıklanamayan tromboz,
- olağan dışı bir bölgede konulan tromboz tanısı,
- kalıtsal veya sonradan edinilmiş aplastik anemi (AA),
- miyelodisplastik sendrom (MDS),
- AA veya MDS'nin ayırt edici tanı olarak değerylendirildiğı açıklanamayan sitopeni ⁽¹⁾

2. Hedef kullanıcı

Cihaz yalnızca profesyonel laboratuvar kullanımı için tasarlanmıştır. Hasta başı testler veya kendi kendine yapılan testler için uygun değildir.

Yeterliliğey ilişkin gereklilikler

Hedef kullanıcı, insan hücrelerinin akış sitometrisi analizi, pipetleme becerileri dâhil olmak üzere standart laboratuvar teknikleri, insan vücudundan elde edilen örneklerin güvenli ve uygun şekilde işlenmesi konularında son teknolojiye uygun uzmanlığa sahip olmalıdır.

Hedef kullanıcı EN ISO 15189 standardına veya varsa diğery ulusal hükümlere uymalıdır.

3. Test prensibi

Test prensibi, insan kan hücrelerinin yüzeyindeki GPI çapası ve GPI bağı proteinlerin tespit edilmesine dayanmaktadır. Testte kullanılan monoklonal antikorlar ve rekombinant proaerolizin, boyanmış kan örneğinin alınması sırasında bir akış sitometresinden çıkan lazer ışını ile uyarılan farklı florokromlarla etiketlenir. Alınan bir kan hücresi üzerinde bulunan her florokromdan gelen sonraki floresan (ışık emisyonu) cihaz tarafından toplanır ve analiz edilir. Floresan yoğunluğu, bir hücredeki antijen ekspresyon yoğunluğuyla doğru orantılıdır ve farklı hücre alt kümelerinin birbirinden ayrılmasını sağlar.

4. Sağlanan reaktif/reaktifler

İçindekiler

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti cihazı, 25 hastanın incelenmesine yetecek şekilde aşağıdaki reaktiflerle birlikte sağlanır:

PNH High-Sensitivity Assay (25 kutu). Her kutu, test tüplerinin (12 x 75 mm) altında bir tabaka hâlindeki stabilize edici bileşenlerle kurutulmuş florokrom etiketli reaktiflerin önceden karıştırılmış kombinasyonlarını içeren 1 renk kodlu (Camgöbeğı şeritli) kapaklı tek kullanımlık **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) tüpü ve 1 renk kodlu

(Kırmızı şeritli) kapaklı tek kullanımlık **PNH RBC 3-color** (ED7750-2) tüpünden oluşur. Tablo 1 ve 2'ye bakın.

Lysing Solution ED7750-3 (1 şişe) 15 ml konsantre (10X) formaldehit bazlı tamponlu çözelti içerir.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 kutu), her bir tüpün dibinde (12 x 75 mm) katman hâlinde stabilize edici bileşenlerle kurutulmuş tek bir florokrom etiketli reaktif bulunan 10 adet kapaklı tek kullanımlık tüpten oluşur.

DİKKAT: PNH Compensation Set yalnızca dengeleme kurulumu için tasarlanmıştır. Tek florokrom etiketli reaktifler (Tablo 1 ve Tablo 2'ye bakın) kolay ve doğru bir dengeleme prosedürü sağlar.

Bileşim

Tablo 1 PNH WBC 7-color aktif bileşenlerinin açıklaması

Antijen	Florokrom	Klon	İzotip
GPI çapası (Proaerolizin)	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

Tablo 2 PNH RBC 3-color aktif bileşenlerinin açıklaması

Antijen	Florokrom	Klon	İzotip
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Gereken ancak sağlanmayan malzemeler

Deiyonize su (Reaktif dereceli)

Fosfat tamponlu salin (1X PBS), pH 7,2 – 7,4

Akış Sitometrisi Dengeleme Partikülleri (Spherotech SPHERO™ COMPTrol Kiti, Kat. No. CMIgP-50-3K veya eşdeğer dengeleme partikülleri)

6. Gerekli ekipman

Örnek ve reaktiflerin pipetlenmesi için tek kullanımlık uçlara sahip otomatik pipet (100 µl – 5 ml)

Eritrosit lizis solüsyonunu dağıtmak için sıvı dispenserı veya tek kullanımlık uçlara sahip pipet (2 ml)

Vorteks mikser

Örnek hazırlamak için kullanılan konik polipropilen santrifüj tüpleri (15 ml veya 50 ml)

12 x 75 mm yuvarlak tabanlı tüpler için uygun rotor adaptörlerine sahip santrifüj
Üç lazer eksitasyon kaynağı (488 nm, ~635 nm ve 405 nm), saçılımlar için dedektörler, optik filtreler ve Tablo 3'te verilen florokromlardan sinyal toplamak için uygun emisyon dedektörlerine sahip akış sitometresi

Tablo 3 Cihazda kullanılan florokromların spektral özelliği

Florokrom	Eksitasyon [nm]	Emisyon [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

NOT: Cihaz, BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) akış sitometrelerinde test edilmiştir.

7. Depolama ve taşıma

20 – 30°C sıcaklıkta muhafaza edin.

Uzun süre ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

Kuru yerde tutun.

DİKKAT: Neme karşı hassas ürün. Folyo paketi ilk kullanım anına kadar açmayın.

Çalışma solüsyonlarının (varsa) saklama koşulları ve stabilitesi hakkında daha fazla bilgi için Prosedür başlıklı Bölüm 10'a (Sağlanan reaktifin/reaktiflerin hazırlanması) bakın.

8. Uyarılar, önlemler ve kullanım kısıtlamaları

GHS Tehlike Sınıflandırması

UYARI: Lysing solution (ED7750-3) tehlikeli olarak sınıflandırılan konsantrasyonlarda formaldehit (CAS No. 50-00-0) ve metanol (CAS No. 67-56-1) içerir.

Etiket öğeleri	Sinyal kelimesi
	Tehlike
	
H ifadeleri	H302: Yutulması halinde zararlıdır. H315: Ciltte tahrişe neden olur. H317: Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir. H319: Gözlerde ciddi tahrişe neden olur. H331: Solunması halinde toksiktir. H335: Solunum yollarında tahrişe neden olabilir. H341: Genetik bozukluklara neden olduğundan şüpheleniliyor. H350: Kansere neden olabilir. H371: Organlarda hasara neden olabilir. H373: Yutulduğunda uzun süreli veya tekrarlanan maruz kalma sonucu böbreklerde hasara neden olabilir. EUH071: Solunum yolunda aşınmaya yol açar.
P ifadeleri	P201: Kullanmadan önce özel talimatları okuyun. P260: Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın. P280: Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın. P308 + P313: Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın. P403 + P233: İyi havalandırılmış bir alanda depolayınız. Kabı sıkıca kapalı tutun.

Ürünün içerdiği kimyasal maddeler ve karışımların oluşturduğu riskler ve bunların nasıl ele alınması ve imha edilmesi gerektiği hakkında ayrıntılı bilgi için www.exbio.cz adresindeki ürün sayfasında yer alan Güvenlik Bilgi Formuna (SDS) bakın.

Biyolojik Tehlike

İnsan biyolojik numuneleri ve kan örnekleri ile bunlara temas eden her türlü madde her zaman bulaşıcı madde olarak kabul edilir.

Cilt, göz ve mukoza zarlarıyla temasını önlemek için kişisel koruyucu ekipman ve güvenlik ekipmanları kullanın.

Bulaşıcı maddelerin taşınması ve imha edilmesine ilişkin geçerli tüm yasa, yönetmelik ve prosedürlere uyun.

Bozulma belirtisi

Sağlanan reaktif normalde tüpün dibinde şeffaf ve kurumuş bir tabaka hâlinde görünür. Görünümünde herhangi bir değişiklik olduğunu, örneğin tüpün içinde nem olduğunu gözlemlerseniz reaktifi kullanmayın.

Kullanım kısıtlamaları

Ürün etiketlerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

Test tüplerini yeniden kullanmayın.

9. Örnek

EDTA, Heparin veya ACD (Asit Sitrat Dekstroz) antikoagülan ile tıbbi cihaz olarak sınıflandırılan örnek kabında toplanan venöz periferik kan kullanın ⁽¹⁾.

Sadece işlem görmemiş örnek kullanın. Önceden çözünmüş, yıkanmış veya seyreltilmiş örnek kullanmayın.

Kan örneğini topladıktan sonra 48 saat içinde işleme alın. Eğer 24 saat içinde işlenecekse örneği laboratuvar sıcaklığında (20-25 °C) tutun. İşlem 24 saatten sonra ancak 48 saat içinde yapılacaksa örneği buzdolabında muhafaza edin ⁽¹⁾.

Endojen İnterferans

Bilimsel literatür araştırması temel alınarak endojen interferans kaynakları Tablo 4'te tanımlanmıştır.

Tablo 4 Cihazın Endojen İnterferansı

Endojen interferans	Etki	Referans
Albümin	Albümin, bağlanma ve büyük miktarlarda ligand salma kabiliyeti nedeniyle yüksek konsantrasyonlarda etkileşime girebilir.	9, 10, 11
Bilirubin (sarılık) (konjuge olmayan)	Bilirubin, yüksek otofloresansı nedeniyle hücrelerin floresan arka planını artırır.	12, 13, 14
Hücre debris (lizis sonrası)	Hücre kalıntıları, yanlış hücre sayımlarına neden olabilir ve cihaz içindeki antikorları tüketebilir.	15, 16
Eritrositler	Yetersiz lizis, numunede bulunan kırmızı kan hücreleri hatalı hücre sayımına neden olabilir.	17
Hemoglobin	Hemolize numuneler güvenilir olmayan sonuçlar verebilir.	18
İnsan anti-murin antikorları	Cihaz işlevselliğini (hücre yüzeyi antijenlerine bağlanma kabiliyeti) etkileyebilir.	19
İmmünoglobülinler	Lenfosit alt küme sayısını etkileyebilir.	12
Romatoid faktörler	RF'nin varlığı MIA (multipleks immünolojik testler) ile etkileşime girer.	20
Trigliseridler	Dolaşımdaki yüksek lipid seviyeleri, belirli kan hücresi popülasyonlarının akış sitometrisi analizini etkileyebilir.	21

Eksojen İnterferans

Sutherland ve diğerleri tarafından yayınlanan makalelere ⁽⁷⁾ göre, kan transfüzyonlarından elde edilen kırmızı kan hücreleri, ekstrasvasküler hemoliz yaşayan büyük PNH klonlu hastaların PNH analizinde önemli bir etkileşimdir. Transfüzyon ile alınan sağlıklı eritrositler, kırmızı kan hücresi soyunda (RBC) PNH klonunun izlenmesini önemli ölçüde etkiler. CD71'in eklenmesi, hastanın hemolitik ve/veya transfüzyon durumundan bağımsız olarak RBC soyundaki PNH klon boyutlarını analiz etme kabiliyetini önemli ölçüde artırır.

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti cihazı, iRBC'lerin ayrıca GPI çapalı CD59 antijenini ifade ettiği olgunlaşmamış kırmızı kan hücresi tanımlaması (iRBC) için CD71 antijeni sunarak daha önce bahsedilen yönergelerle göre bu sorunun üstesinden gelir. Transfüzyon torbalarında, iRBC'ler genellikle çok düşük bir miktarda temsil edilir ⁽²²⁾. Öte yandan, PNH'nin neden olduğu ekstrasvasküler hemoliz yaşayan hastalarda, hızlı eritrosit kaybına bağlı olarak iRBC sayısı artış gösterir ⁽²³⁾. Bu nedenle, iRBC tanımlaması için CD71 monoklonal antikorunun eklenmesiyle, iRBC'lerde CD59 antijeni kaybı olarak raporlanan PNH ilerlemesinin

hekim tarafından daha doğru bir şekilde izlenmesi ve transfüzyon torbalarındaki ekzojen RBC'lerin etkileşiminin engellenmesi mümkündür. DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti, anti-insan CD71 antikoru içerir ve PNH klonu tespiti ve miktar tayini için en son yönergelerin kullanılmasına olanak sağlar.

10.Prosedür

Sağlanan reaktifin/reaktiflerin hazırlanması

PNH High-Sensitivity Assay

Reaktif hazırlamaya gerek olmayıp sadece tek kullanımlık test tüplerinde sağlanır.

Lysing Solution

Reaktifi kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin.

Reaktif 10X konsantredir ve kullanımdan önce deiyonize su ile seyreltilmelidir (1 hacim konsantre çözelti ve 9 hacim deiyonize su). İlk açılışından sonra reaktif, orijinal birincil kabında belirtilen koşullarda muhafaza edildiğinde son kullanma tarihine kadar performans özelliklerini korur.

Seyreltilmiş (1X) lizis solüsyonu, sıvı bir dispenserde veya kapalı bir kapta oda sıcaklığında muhafaza edildiğinde 1 ay boyunca stabil kalır.

Gereken ancak sağlanmayan malzemelerin hazırlanması

Dengeleme partikülleri

Üreticinin talimatlarına göre akış sitometrisi dengeleme partiküllerinin çalışma solüsyonunu hazırlayın.

Dengeleme kurulumu

PNH RBC 3-color ve PNH WBC 7-color boyalı tüplerin analizinden önce aynı akış sitometresi kurulumunu kullanarak Dengeleme Seti tüplerini alın.

DİKKAT: PNH RBC 3-color ve PNH WBC 7-color dengeleme kurulum prosedürleri örnek hazırlama ve örnek boyama türüne göre farklılık gösterir.

PNH RBC 3-color dengeleme tüpleri (Kırmızı şeritli)

1. Her tek renkli dengeleme tüpünün altına **SPHERO™ COMPTrol Kiti** veya **eşdeğer dengeleme partikülleri** ekleyin.
2. Karıştırın ve karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edin.
3. Her bir dengeleme tüpüne 4 ml 1X PBS ekleyin. 300×g'de 5 dakika boyunca santrifüjleyin.
4. Dengeleme partiküllerini bozmadan süpernatantı atın ve her dengeleme tüpüne 0,1 ml 1X PBS ekleyin.

5. Boyalı örnek analizinden önce ilgili floresan dedektörlerindeki gerilimleri ayarlayın. PMT dedektöründeki gerilim yeterli düzeyde yüksek ayarlanmalı, böylece en az negatif boyalı olay floresan eksenindeki 0. kanalla etkileşime girmelidir. PMT dedektörü gerilimi de pozitif olayların sağ eksene baskılandığı değerleri aşmamalıdır.
6. Boyalı dengeleme tüplerini akış sitometresi kullanarak anında alın.
7. PNH RBC 3-color dengeleme matrisini üretici tarafından geliştirilen sitometre yazılımında veya çevrim dışı sitometri veri analizi için özel yazılımda hesaplayın. Bu dengeleme matrisini PNH RBC 3-color lotunun tüm test tüplerinde kullanın.

DİKKAT: Belirli bir PNH RBC 3-color lotuna ayarlandıktan sonra, aynı dengeleme matrisi alım ayarlarını ve dengeleme sonuçlarını korumak için floresan dedektör ayarlarını değiştirmeyin.

PNH WBC 7-color dengeleme tüpleri (Camgöbeği şeritli)

1. Tek renkli dengeleme tüplerinin her birinin dibine 50 µl deiyonize su ekleyin ve 7 – 10 saniye boyunca kuvvetlice karıştırın.
2. Tek renkli dengeleme tüplerinin her birine 100 µl periferik tam kan ekleyin ve kuvvetlice karıştırın.
3. Karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edin.
4. Her dengeleme tüpüne 2 ml seyreltilmiş (1X) Lysing Solution ekleyin.
5. Karanlıkta oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edin.
6. 300×g'de 5 dakika boyunca santrifüjleyin, süpernatantı atın ve hücre peletini 2 ml 1X PBS içinde yeniden süspanse edin.
7. 300×g'de 5 dakika boyunca santrifüjleyin, süpernatantı atın ve hücre peletini 0,2 ml 1X PBS içinde yeniden süspanse edin.
8. Boyalı örnek analizinden önce ilgili floresan dedektörlerindeki gerilimleri ayarlayın. PMT dedektöründeki gerilim yeterli düzeyde yüksek ayarlanmalı, böylece en az negatif boyalı olay floresan eksenindeki 0. kanalla etkileşime girmelidir. PMT dedektörü gerilimi de pozitif olayların sağ eksene baskılandığı değerleri aşmamalıdır.
9. Boyalı dengeleme tüplerini akış sitometresi kullanarak anında alın.
10. PNH WBC 7-color dengeleme matrisini üretici tarafından geliştirilen sitometre yazılımında veya çevrim dışı sitometri veri analizi için özel yazılımda hesaplayın. Bu dengeleme matrisini PNH WBC 7-color lotunun tüm test tüplerinde kullanın.

DİKKAT: Belirli bir PNH WBC 7-color lotuna ayarlandıktan sonra, aynı dengeleme matrisi alım ayarlarını ve dengeleme sonuçlarını korumak için floresan dedektör ayarlarını değiştirmeyin.

Örnek hazırlama

PNH RBC 3-color tüpü kullanılarak eritrositlerdeki PNH klonlarının tespit edilmesi ve ayrıştırılması, boyama prosedüründen önce örneğin hazırlanmasını gerektirir.

NOT: Örneği işleme almadan önce sitometrenin doğru şekilde ayarlandığından emin olun.

1. Bir polipropilen konik tüpü incelenen kan örneğinin tanımıyla etiketleyin.
2. Etiketli konik tüpün dibine 10 µl iyice karıştırılmış kan örneği pipetleyin.
3. Kan örneğini 1 ml 1X PBS ile 1:100 oranında seyreltin ve 5 saniye boyunca elinizde sallayarak karıştırın.

DİKKAT: Klasik PNH formuna intravasküler hemoliz hakimdir. Kan örneğini seyreltmeden önce, seyreltilmiş kan örneğinde $3 - 5 \times 10^7/\text{ml}$ seyreltilmiş kan aralığında RBC sayımı yapmak için hematoloji analizöründen alınan RBC sayımlarına bakın ve akış sitometresinde yeterli RBC sayımı elde etmek için seyreltme faktörünü gereken şekilde ayarlayın.

4. Örnek seyreltmesinin hemen ardından Örnek boyama prosedürüne geçin.

PNH WBC 7-color tüpü kullanılarak nötrofiller ve monositlerdeki GPI eksikliği olan hücrelerin tespit edilmesi, boyama prosedüründen önce örnek hazırlanmasını gerektirmez.

Örnek boyama – PNH RBC 3-color tüp (Kırmızı şeritli)

1. PNH RBC 3-color tüpü incelenen kan örneğinin tanımıyla etiketleyin.
2. PNH RBC 3-color tüpünün dibine 50 µl iyice karıştırılmış seyreltilmiş kan örneği pipetleyin.

DİKKAT: Test tüpünün yan tarafına kan damlatmaktan kaçının. Tüpün kenarında kan lekesi veya damlacık kalırsa reaktifte boyanmayacaktır ve test sonuçlarının doğru olmama ihtimali doğacaktır.

3. 7 – 10 saniye boyunca kuvvetlice karıştırın.

DİKKAT: Vorteks süresinin kısaltılması test sonuçlarını etkileyebilir.

4. PNH RBC 3-color tüpü karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edin.
5. PNH RBC 3-color tüpüne 4 ml 1X PBS ekleyin.
6. PNH RBC 3-color tüpünü 300× g'de 5 dakika boyunca santrifüjleyin.

7. Hücre peletini bozmadan süpernatantı atın ve PNH RBC 3-color tüpüne 0,5 ml 1X PBS ekleyin.
8. Hücre peletini yeniden süspanse etmek için kısa süre karıştırın.

Boyalı örneği akış sitometresi kullanarak alın. Boyalı örnek hemen alınmayacaksa test tüpünün kapağını kapatın, 2 – 8°C sıcaklıkta karanlık ortamda saklayın ve 2 saat içinde analiz edin.

DİKKAT: Akış sitometresinde toplamadan hemen önce test tüpünü tüp rafının üst kısmına doğru 6-10 kez kaydırarak lekeli numunedeki hücre kümelerini bozun. Aşırı miktarda RBC kümesi olması test sonuçlarını etkileyebilir.

Örnek boyama – PNH WBC 7-color tüp (Camgöbeği şeritli)

1. PNH WBC 7-color tüpü incelenen kan örneğinin tanımıyla etiketleyin.
2. PNH WBC 7-color test tüpüne **50 µl deiyonize su ekleyin.** 7 – 10 saniye boyunca kuvvetlice karıştırın.

DİKKAT: Vorteks süresinin kısaltılması test sonuçlarını etkileyebilir.

3. PNH WBC 7-color tüpünün dibine **100 µl iyice karıştırılmış kan örneği** pipetleyin ve kuvvetli bir şekilde karıştırın.

DİKKAT: Test tüpünün yan tarafına kan damlatmaktan kaçının. Tüpün kenarında kan lekesi veya damlacık kalırsa reaktifte boyanmayacaktır ve test sonuçlarının doğru olmama ihtimali doğacaktır.

4. Karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edin.
5. PNH WBC 7-color tüpüne 2 ml 1X çalışan eritrosit Lizis Solüsyonu ekleyin.
6. Karanlıkta oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edin.
7. PNH WBC 7-color tüpünü 300× g'de 5 dakika boyunca santrifüjleyin.
8. Hücre peletini bozmadan süpernatantı atın ve test tüpüne 2 ml 1X PBS ekleyin.
9. PNH WBC 7-color tüpünü 300× g'de 5 dakika boyunca santrifüjleyin.
10. Hücre peletini bozmadan süpernatantı atın ve test tüpüne 0,2 ml 1X PBS ekleyin.

11. Hücre peletini yeniden süspanse etmek için kısa süre karıştırın.

Boyalı örneği akış sitometresi kullanarak alın. Boyalı örnek hemen alınmayacaksa test tüpünün kapağını kapatın, 2 – 8°C sıcaklıkta karanlık ortamda saklayın ve 24 saat içinde analiz edin.

Akış sitometrisi analizi

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit cihazı ile kullanılmak üzere seçilen akış sitometresi, sitometre üreticilerinin talimatlarına göre dedektörlerin sabit hassasiyetini sağlamak için floresan mikro boncuklar kullanılarak rutin olarak kalibre edilmelidir.

Akış sitometresinin bakımı düzgün yapılmazsa yanlış sonuçlar verebilir.

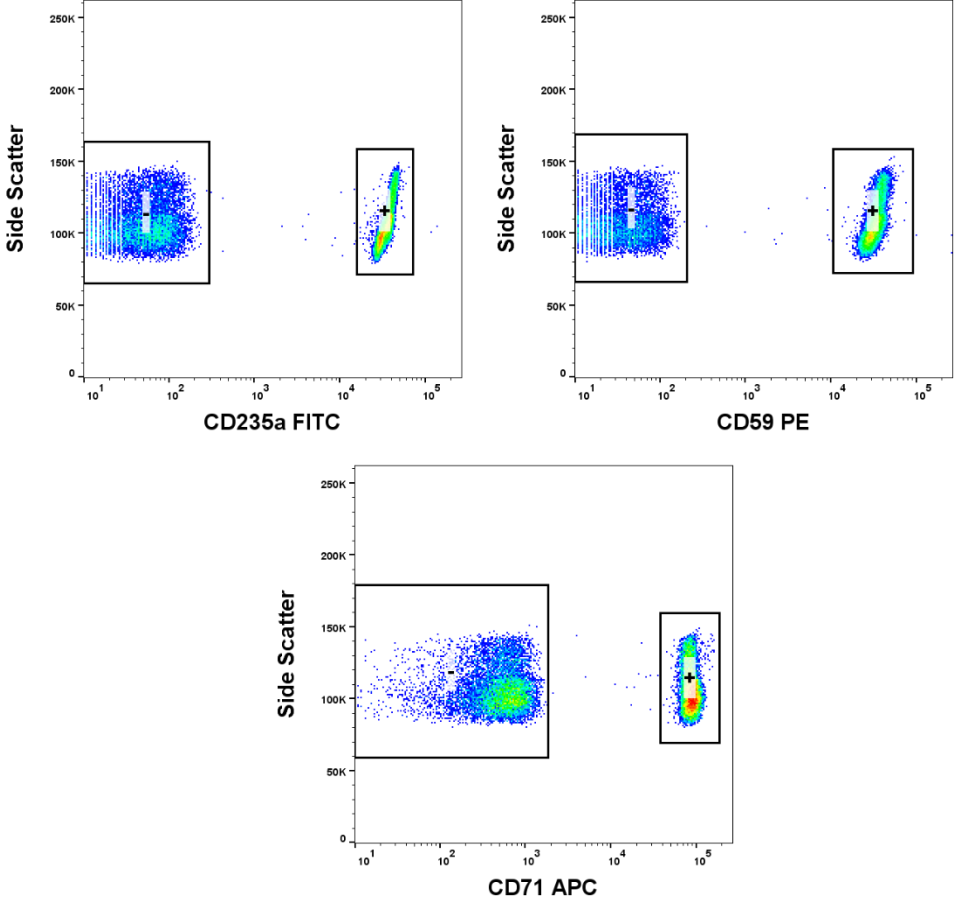
Gerekli ekipman başlıklı Bölüm 6'daki florokromların eksitasyon ve emisyon özelliklerine uygun lazerler ve floresan dedektörleri için üreticinin sitometre spesifikasyonlarına bakın.

Ölçülen veri analizi için üretici tarafından geliştirilen sitometre yazılımı veya çevrim dışı sitometri veri analizine özel yazılım (örneğin FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™) kullanılabilir.

PNH RBC 3-color dengeleme tüplerinin analizi (Kırmızı şeritli)

Her dengeleme tüpü için dengelenmeyen verileri bir yana saçılım (SSC) ve "dengelenecek florokrom" noktasal grafiğinde görselleştirin. Pozitif (+) ve negatif (-) sitometri dengeleme partikülleri için geçitleri Şekil 1'de gösterildiği gibi ayarlayın.

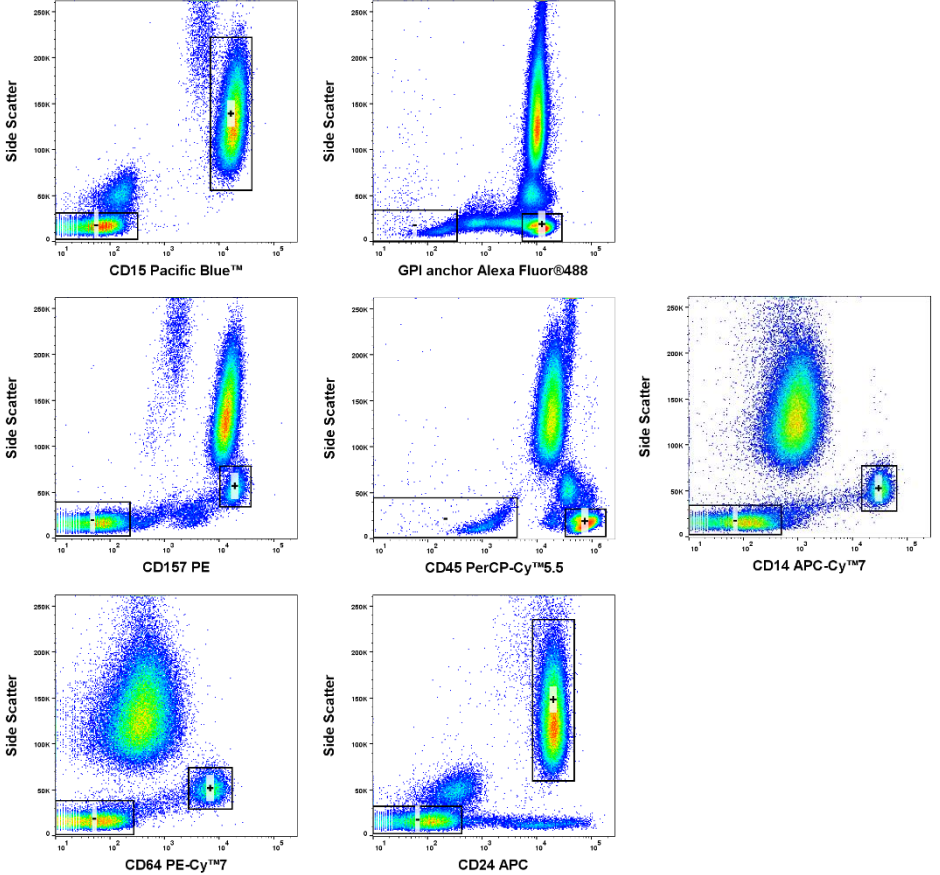
Şekil 1 Dengeleme tüplerindeki pozitif (+) ve negatif (-) sitometri dengeleme partiküllerinin tanımlanması (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



PNH WBC 7-color dengeleme tüplerinin analizi (Camgöbeği şeritli)

Her dengeleme tüpü için dengelenmeyen verileri bir yana saçılım (SSC) ve "dengelenecek florokrom" noktasal grafiğinde görselleştirin. En pozitif (+) ve en negatif (-) popülasyonlar için kapıları Şekil 2'de gösterildiği gibi ayarlayın.

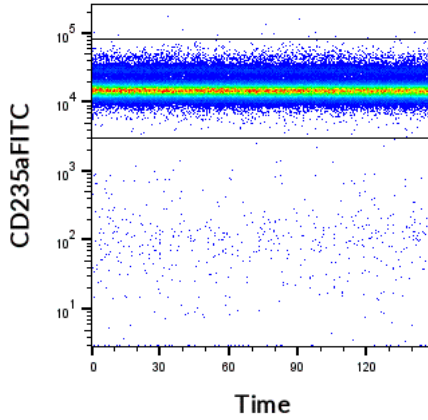
Şekil 2 Dengeleme tüplerindeki en pozitif (+) ve en negatif (-) olayların tanımlanması (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



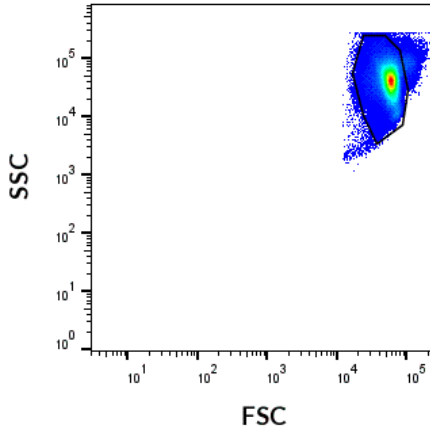
PNH RBC 3-color t p (Kırmızı şeritli)

Seyreltilmiş kan örneğindeki düşük iRBC sayısı nedeniyle, analiz için en az 500.000 eritrosit olayı toplayın. 500.000'den fazla örnek alınması uzun alım sürelerine neden olur. Bu, antikor-antijen bağlayıcı kompleks dengesini ve CD235a FITC floresansının azalmasını etkileyebilir. Toplama süresi boyunca floresan yoğunluğunun stabilitesini sürekli takip edin (şekil 3).

şekil 3 Toplanan tüm olayları Zaman ve CD235a FITC (BD FACSLytic™ üzerinde elde edilen veriler) nokta grafiğinde kontrol edin.

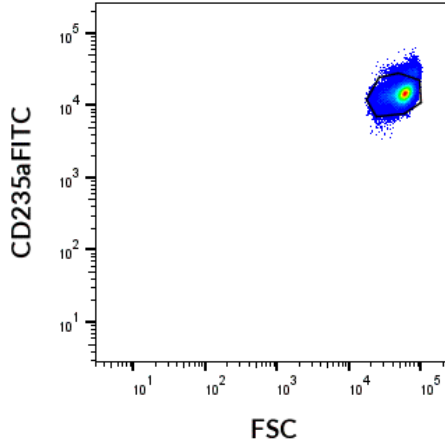


şekil 3a Zaman geçidindeki tüm olayları logaritmik modda FSC-A ve SSC-A nokta grafiğinde görüntüleyin (BD FACSLytic™ üzerinde toplanan veriler).



SSC ve FSC geçidinden gelen dengelenmiş verileri logaritmik modda bir nokta grafiğinde görselleştirin. Burada X eksenini FSC'yi ve Y eksenini FITC kanalındaki floresan yoğunluğunu temsil eder. "CD235a+ RBC singletleri" geçidini oluşturun (Şekil 4).

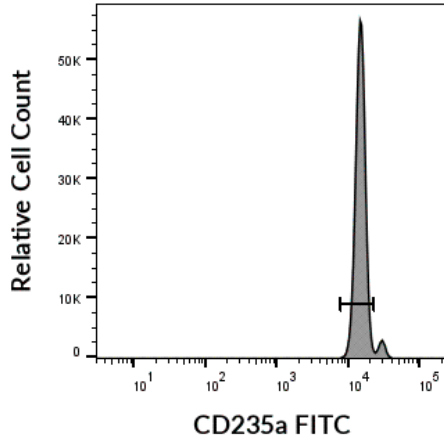
Şekil 4 CD235a+ RBC singletlerinin belirlenmesi (BD FACSLyric™ üzerinde toplanan veriler).



İsteğe bağlı:

Singletlerin daha iyi ayırt edilebilmesi için dengelenmiş verileri X ekseninin FITC kanalındaki floresan yoğunluğunu temsil ettiği bir histogram olarak görselleştirmek mümkündür. "CD235a+ RBC singletleri" geçidini oluşturun (Şekil 4a).

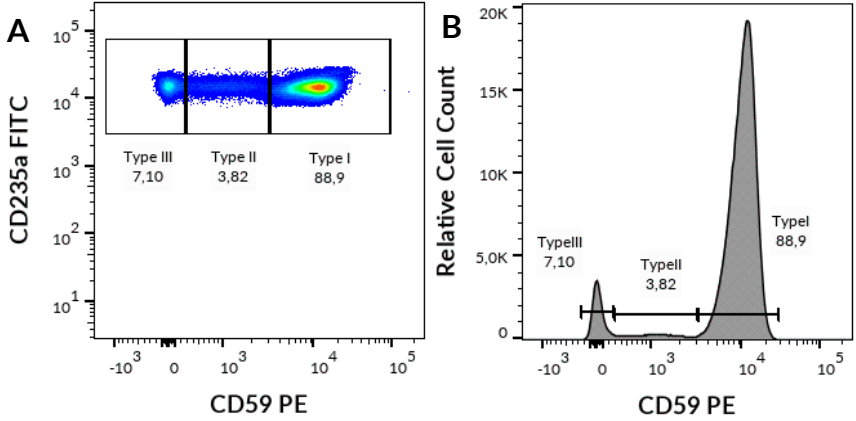
Şekil 4a CD235a+ RBC singletlerinin belirlenmesi (BD FACSLyric™ üzerinde toplanan veriler).



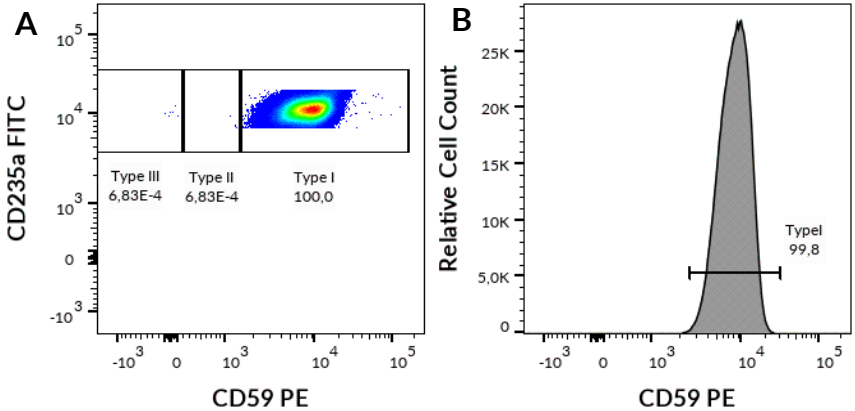
Eritrositler

CD235a+ RBC singletlerini, CD59 PE ve CD235a FITC nokta grafiğinde görselleştirin. Üç uygun geçit kullanarak olayları üç popülasyona ayırın (Şekil 5a, 5b) ve Tip I, Tip II ve Tip III bölgelerindeki olayların yüzdesini hesaplayın. Bazı durumlarda Tip II ve III arasındaki bölgelerin daha iyi ayarlanması için bir histogram yararlı olabilir.

Şekil 5a PNH klonu olan hasta: A) CD59 PE ve CD235a FITC nokta grafiğinde CD235a+ RBC singletleri; B) CD59 PE histogramında CD235a+ RBC singletleri (BD FACSLytic™ üzerinde toplanan veriler).



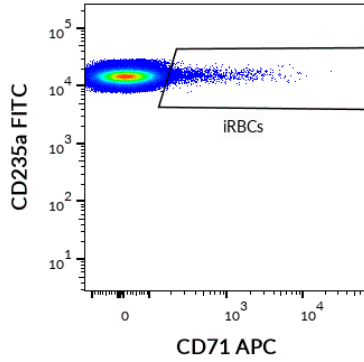
Şekil 5b Sağlıklı donör: A) CD59 PE ve CD235a FITC nokta grafiğinde CD235a+ RBC singletleri; B) CD59 PE histogramında CD235a+ RBC singletleri (BD FACS Lyric™ üzerinde toplanan veriler).



iRBC (olgunlaşmamış retikülositler)

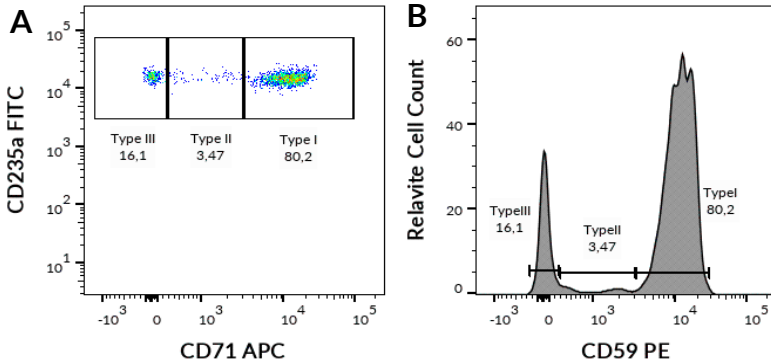
Kan transfüzyonu yapılan hastalarda PNH tip II ve III RBC'lerin gerçek yüzdesini belirlemek zor olabilir. PNH hastasının kanında dolaşan ve bir kan donöründen alınan sağlıklı RBC'ler doğru PNH klon boyutu yüzdesini etkiler. CD71 eklenmesi, donörün transfüze edilen hücrelerini geçidin dışında bırakmaya yardımcı olabilir ⁽⁶⁾. CD235a+ RBC singletlerini, CD71 APC -ve CD235a FITC nokta grafiğinde görselleştirin ve CD71+ iRBC'lerini ayırın (Şekil 6).

Şekil 6 CD71 APC ve CD235a FITC noktasal grafiğinde CD235a+ RBC singletleri. CD71+ iRBC grafiği (BD FACSLytic™ II'de elde edilen veriler).



CD71+ iRBC'leri, CD59 PE ve CD235a FITC nokta grafiğinde ve CD59 PE histogramında görselleştirin (Şekil 7). Üç uygun geçit kullanarak olayları üç popülasyona ayırın ve Tip I, Tip II ve Tip III bölgelerindeki olayların yüzdesini hesaplayın.

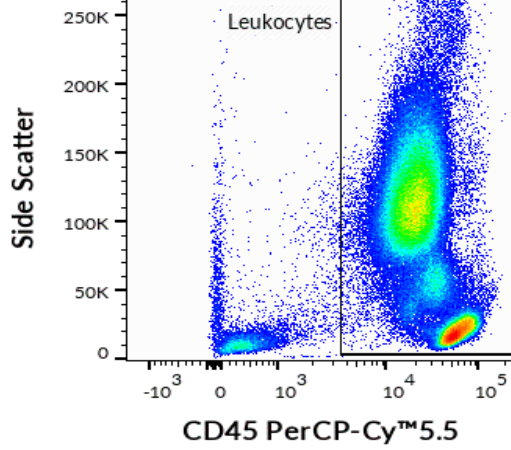
Şekil 7 PNH klonu olan ancak transfüzyon yapılmayan hasta: A) CD59 PE ve CD235a FITC nokta grafiğinde CD71+ iRBC'ler; B) CD59 PE histogramında CD71+ iRBC'ler (BD FACSLytic™ üzerinde toplanan veriler).



PNH WBC 7-color tüpü (Camgöbeği şeritli)

En az 50.000 nötrofil ve 10.000 monosit toplayın. Bu, analiz için en az 200.000 olay toplandığı anlamına gelir. Dengelenmiş verileri PerCP-Cy™ 5.5'teki yana saçılım ve floresan yoğunluğu s noktasal grafiğinde görselleştirin. CD45+ lökosit geçidini Şekil 8'de gösterildiği gibi ayarlayın.

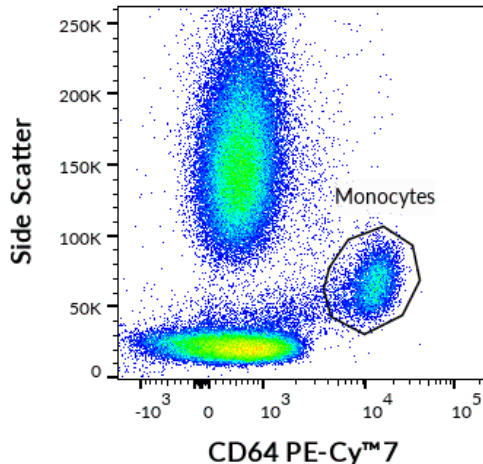
Şekil 8 CD45+ Lökositlerin Grafiği (BD FACSLytic™'de elde edilen veriler).



Monositler

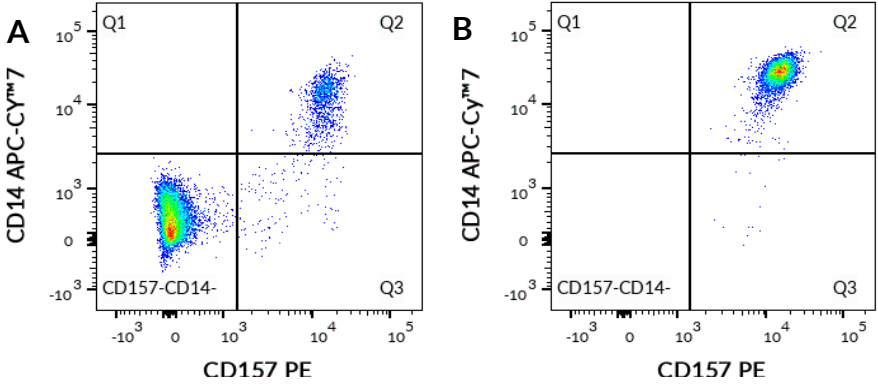
CD45+ lökositleri yana-saçılım ve CD64 PE-Cy™7 noktasal-grafiginde görselleştirin ve CD64+ monositleri Şekil 9'da gösterildiği gibi sınırlandırın.

Şekil 9 Lökositlerdeki CD64+ Monositlerin Grafiği (BD FACSLytic™'de elde edilen veriler).



CD157 PE ve CD14 APC-Cy™7 noktasal-grafigindeki CD64+ Monositlerini görselleştirin (Şekil 10). Uygun geçitleri ayarlayın ve CD157-CD14- popülasyon yüzdesini hesaplayın.

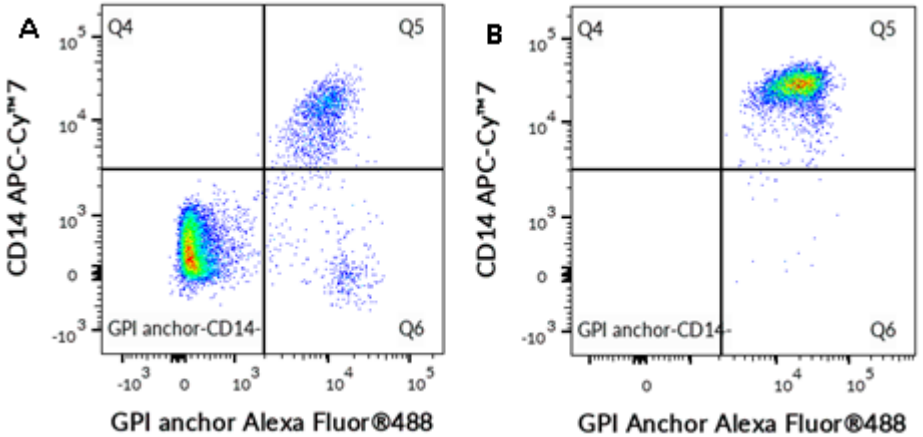
Şekil 10 CD157 PE ve CD14 APC-Cy™7 noktasal grafiğindeki CD64+ Monositleri (BD FACSLytic™’de elde edilen veriler). A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Ardından aynı CD64+ monositleri GPI çapası Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) ve CD14 APC-Cy™7 nokta -grafiğinde görselleştirin (Şekil 11). Uygun geçitleri ayarlayın ve Q4 çeyreğindeki GPI çapası- CD14- popülasyonunun yüzdesini hesaplayın.

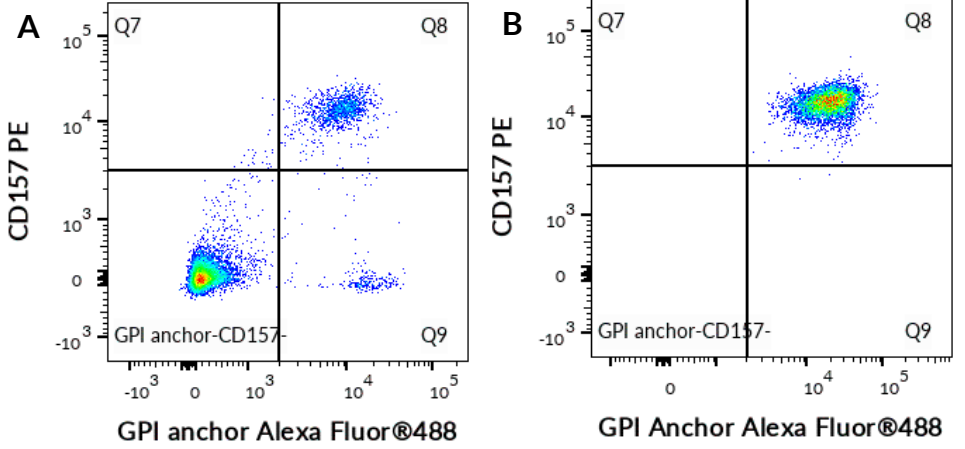
Şekil 11 GPI çapası Alexa Fluor® 488 ve CD14 APC-Cy™7 noktasal grafiğinde CD64+ Monositleri (BD FACSLytic™’de elde edilen veriler).

A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Ardından aynı CD64+ monositleri, GPI çapası Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) ve CD157 PE noktasal-grafiginde görselleştirin (Şekil 12). Uygun geçitleri ayarlayın ve GPI çapası- CD157- popülasyonunun yüzdesini hesaplayın.

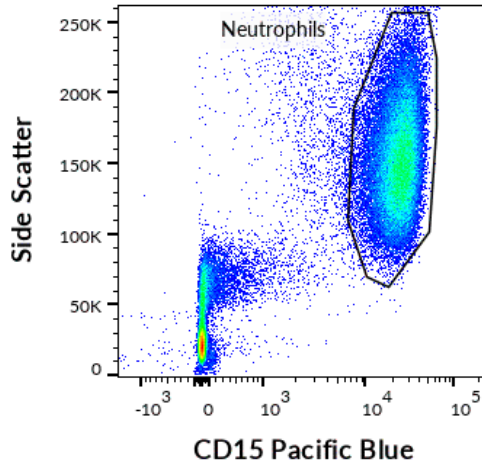
Şekil 12 GPI çapası Alexa Fluor® 488 ve CD157 PE noktasal grafiğinde CD64+ Monositleri (BD FACSLytic™'de elde edilen veriler). A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Nötrofiller

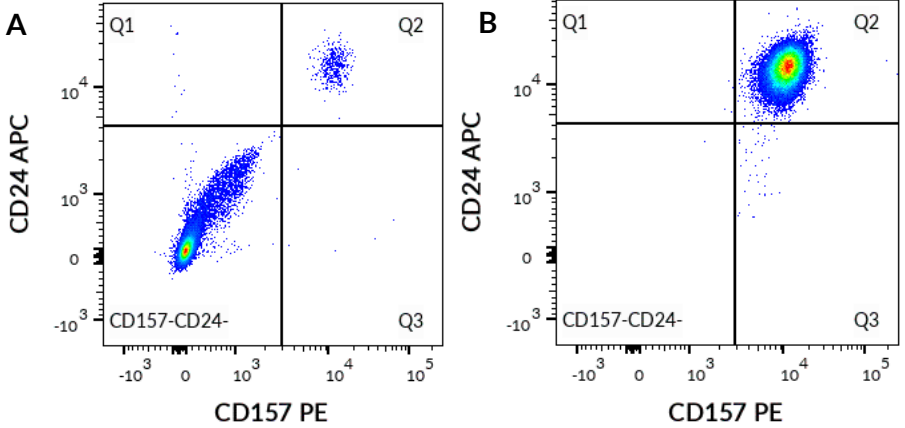
CD45+ lökositleri yana-saçılım ve CD15 Pacific Blue™ noktasal-grafiginde görselleştirin ve CD15+ nötrofilleri Şekil 13'te gösterildiği gibi ayırın.

Şekil 13 Lökositlerdeki CD15+ Nötrofillerin Grafiği (BD FACSLytic™'de elde edilen veriler).



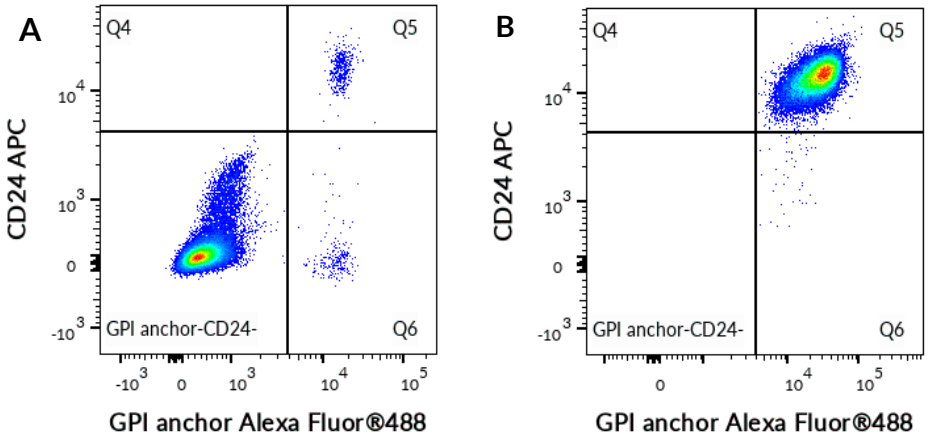
CD15+ nötrofilleri CD157 PE ve CD24 APC noktasal-grafiginde Şekil 14'te gösterildiği gibi görselleştirin. Uygun geçitleri oluşturun ve CD157-CD24- popülasyon yüzdesini hesaplayın.

Şekil 14 CD157 PE ve CD24 APC noktasal-grafiginde CD15+ Nötrofiller (BD FACSLytic™'de elde edilen veriler). A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



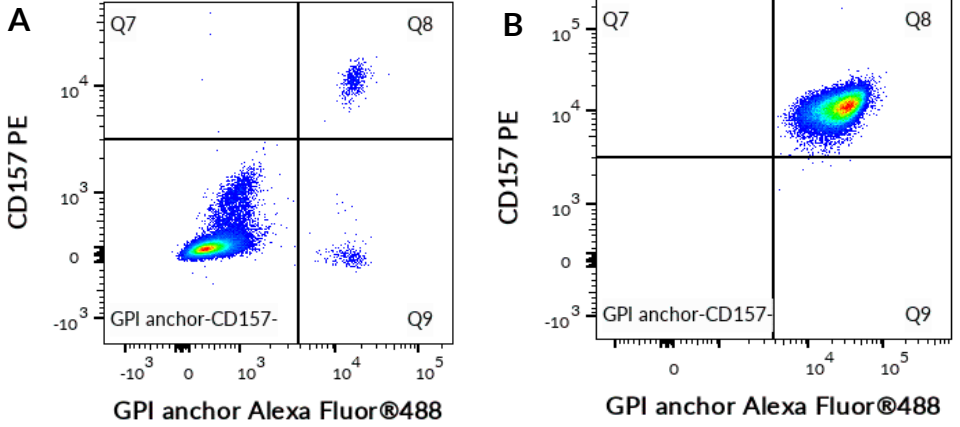
Ardından aynı CD15+ nötrofilleri GPI çapası Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) ve CD24 APC noktasal-grafiginde görselleştirin. Uygun geçitleri ayarlayın GPI çapası-CD24- popülasyonunun yüzdesini Şekil 15'te gösterildiği gibi hesaplayın.

Şekil 15 GPI çapası Alexa Fluor® 488 ve CD24 APC noktasal-grafiginde CD15+ Nötrofiller (BD FACSLytic™'de elde edilen veriler). A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Ardından aynı CD15+ nötrofilleri GPI çapası Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) ve CD157 PE noktasal-grafiğinde görselleştirin. Uygun geçitleri ayarlayın ve Şekil 16'da gösterildiği gibi GPI çapası-CD157- popülasyonunun yüzdesini hesaplayın.

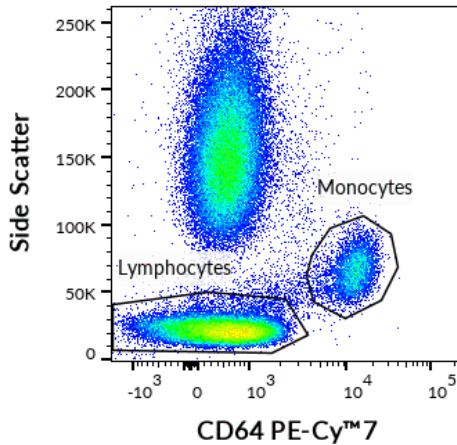
Şekil 16 GPI çapası Alexa Fluor® 488 ve CD157 PE noktasal-grafiğinde CD15+ Nötrofiller (BD FACSLytic™'de elde edilen veriler). A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Dahili kontrol

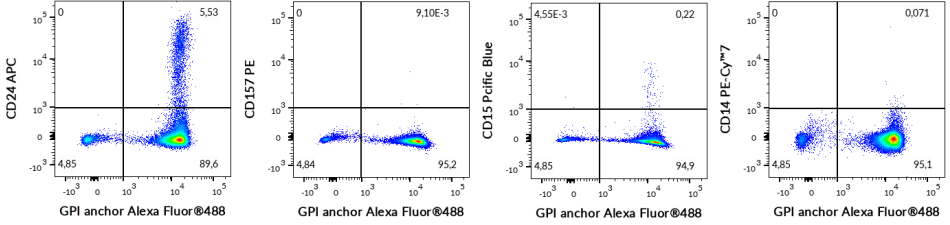
Floresan dedektör gerilimini ve dengelemesini doğrulamak için dahili kontrole bakmak gerekir (Şekil 18). CD64 PE-Cy™7 ve yana saçılım grafiğinde, dahili kontrol popülasyonu olarak lenfositleri bir geçitle tanımlayın (Şekil 17).

Şekil 17 Lökositlerden CD64- Lenfositler grafiği (BD FACSLytic™ üzerinde toplanan veriler).



Ardından gerilim ayarlarının, kompanzasyonun ve antikor performansının doğrulanması için lenfositleri GPI çapası Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) ve CD24 APC/CD157 PE/CD15 Pacific Blue™/CD14 PE-Cy™7 nokta grafiklerinde görselleştirin (Şekil 18).

Şekil 18 Dahili kontroller (BD FACSLyric™ üzerinde toplanan veriler).



Analitik sonuçların hesaplanması ve yorumlanması

GPI eksikliği olan (PNH fenotipine sahip) hücrelerin yüzdesini sıralayın. Tablo 5'e bakın.

Tablo 5 PNH klon fenotipleri

Ana hücre popülasyonu		Geçit stratejisine göre PNH fenotipi
PNH RBC 3-color Tüp	Eritrositler (Tip III)	CD59- CD235a+ (Şekil 5)
	Eritrositler (Tip II)	CD59 düzeyi düşük CD235a+ (Şekil 5)
	iRBCs (Tip III)	CD59- CD235a+ CD71+ (Şekil 7)
	iRBCs (Tip II)	CD59 düzeyi düşük CD235a+ CD71+ (Şekil 7)
PNH WBC 7-color Tüp	Monositler	CD14- CD157- CD64+ (Şekil 10)
		CD14- GPI çapası- CD64+ (Şekil 11)
		CD157- GPI çapası- CD64+ (Şekil 12)
	Nötrofiller	CD24- CD157- CD15+ (Şekil 14)
		CD24- GPI çapası- CD15+ (Şekil 15)
		CD157- GPI çapası- CD15+ (Şekil 16)

Tablo 6 Sonuçların yorumlanması

WBC ve RBC tüpleri için tespit sınırı (LOD), n = 4 farklı sitometre platformunda n = 25 normal hasta örneğinin 100 kez ölçülmesiyle hesaplanan ana frekans (%) olarak raporlanmıştır				
PNH fenotipi	Sitometre			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
PNH RBC 3-color Tüp				
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	0,005	0,002	0,029	0,049
CD59- Tip II ve Tip III iRBC'leri	0,240	0,320	0,388	0,562
PNH WBC 7-color Tüp				
CD14- CD157- Monositler	0,20	0,19	0,14	0,30
GPI çapası- CD14- Monositler	0,08	0,04	0,10	0,17
GPI çapası- CD157- Monositler	0,07	0,06	0,04	0,03
CD157- CD24- Nötrofiller	0,02	0,02	0,06	0,03
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	0,03	0,03	0,02	0,02
GPI çapası- CD157- Nötrofiller	0,01	0,01	0,01	0,01

GPI eksikliği raporlama algoritması kuralları ⁽⁶⁾:

1. RBC tüpünde bir PNH klonu rapor edin

Hücre popülasyonu	Frekans	Sonuç ifadesi ve yapılacak işlem ⁽⁶⁾
CD59- Tip II + Tip III RBC'ler	< LOD	"PNH hücresi tespit edilmedi" Tespit düzeyinin altında kaydedilen nadir PNH fenotipli hücreler
	> %1	"PNH klonu mevcut" Hücre yüzdesi rapor edilebilir
	> LOD (Tablo 6) < % 0,01 ⁽⁶⁾	"PNH hücreleri mevcut" Miktar tayini seviyesinin altında kaydedilen nadir PNH fenotip hücreleri

2. WBC tüpünde bir PNH klonu rapor edin

Hücre popülasyonu	Frekans (%)	Sonuç ifadesi ve yapılacak işlem ⁽⁶⁾
GPI çapası- CD14- Monositler	< LOD	"PNH hücresi tespit edilmedi" Tespit düzeyinin altında kaydedilen nadir PNH fenotipli hücreler
	> %1	"PNH klonu mevcut" Hücre yüzdesi rapor edilebilir
	> LOD (Tablo 6); <LLOQ (Tablo 13, 14)	"PNH hücreleri mevcut" Hücre yüzdesi rapor edilebilir
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	< LOD	"PNH hücresi tespit edilmedi" Tespit düzeyinin altında kaydedilen nadir PNH fenotipli hücreler
	> %1	"PNH klonu mevcut" Hücre yüzdesi rapor edilebilir
	> LOD (Tablo 6); <LLOQ (Tablo 13, 14)	"PNH hücreleri mevcut" Hücre yüzdesi rapor edilebilir

3. RBC'lerdeki PNH klon boyutunu rapor edin.

Toplam PNH klon boyutunun yanı sıra Tip II ve Tip III PNH popülasyonu için yüzdeleri Tablo 7'ye göre elde edilen hücre popülasyonu sayımıyla birlikte rapor edin.

4. WBC'lerdeki PNH klon boyutunu rapor edin.

PNH klon boyutunu her iki soyda da (nötrofiller ve monositler) rapor edin. WBC PNH klonları, kümelenmiş ve rastgele ikili negatif olaylardan daha az saçılmış görünür. Monositler nötrofillerden daha büyük PNH klon boyutları gösterebilir ⁽²⁾.

GPI eksikliği (PNH klonunun varlığı), verilen lökosit alt kümesindeki tüm PNH fenotiplerinde ifade edilmelidir. Tüm monosit PNH fenotiplerinin (Tablo 5) GPI eksikliği olan hücreleri benzer şekilde boyaması beklenir ⁽⁶⁾. Aynıısı nötrofil PNH fenotipleri için de geçerlidir.

PNH klonunu raporlama terminolojisi (CLSI H52-A2'ye göre):

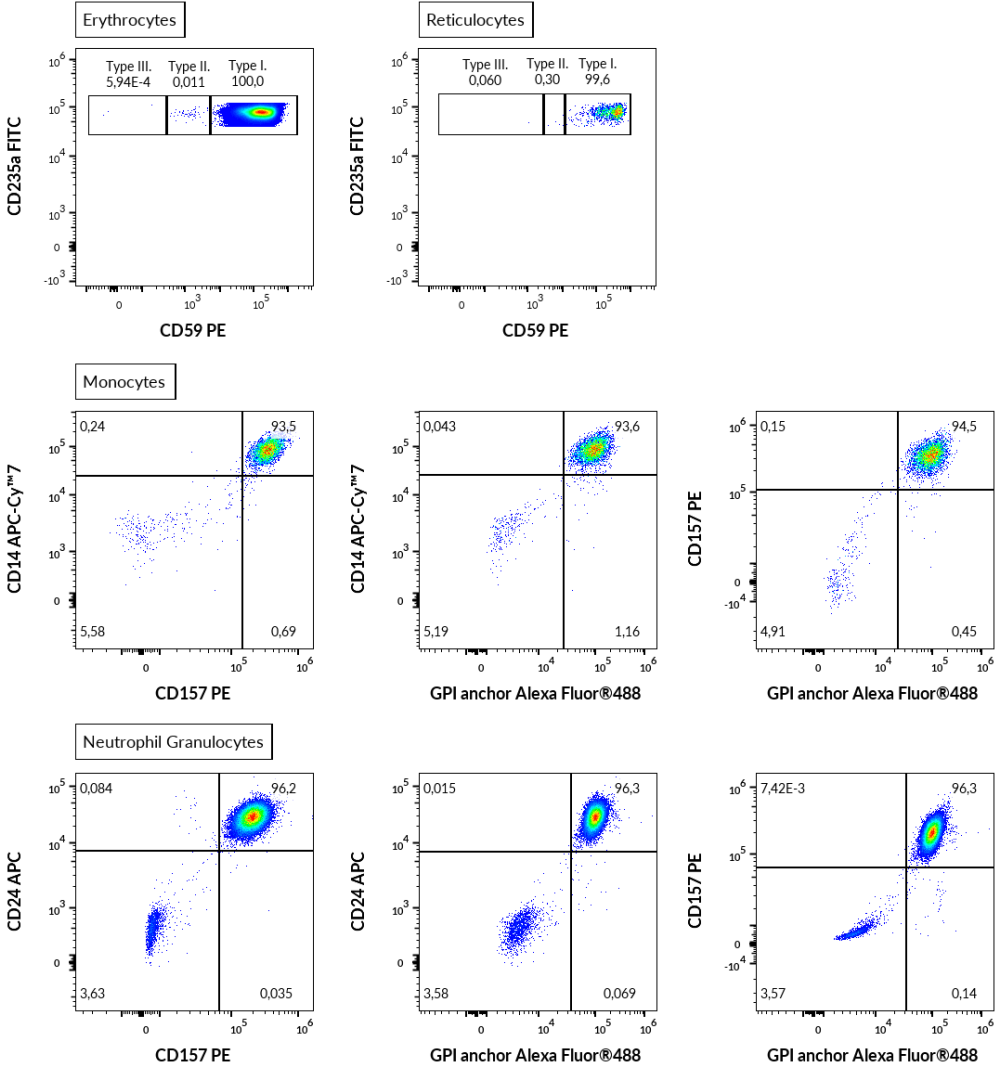
- PNH popülasyonu >%1: "PNH klonu"
- PNH popülasyonu %0,1 ila %1: "minör PNH klonu"
- PNH popülasyonu <%0,1: "PNH fenotipine sahip nadir hücreler"

Tablo 7 BD FACLyric™ akış sitometresi için olası inceleme sonuçlarına örnekler (tek bir hastadan değil).

PNH fenotipi	PNH olay sayısı	Ana popülasyon olay sayısı	Frekans	LLOQ	Değerlendirme
CD59- CD235a+ RBC'ler	3 olay	521.023 singlet RBC olayları	%0,0006	%0,01 ⁽⁶⁾	"PNH hücresi tespit edilmedi" Tespit düzeyinin altında kaydedilen nadir PNH fenotipli hücreler
CD24- GPI çapası- CD15+	69.851 olay	75.849 nötrofil	%92,1	%0,088 (Tablo 13)	"PNH klonu tespit edildi" %92,1 nötrofil PNH klon boyutu
CD14- GPI çapası- CD64+	13 olay	12.497 monosit	%0,103	%0,141 (Tablo 13)	"PNH hücreleri mevcut; Minör PNH klonu" %0,103 monosit PNH klon boyutu

5. **Histogramlar ve nokta grafikleri** isteğe bağlı olarak rapora dahil edilebilir.

Şekil 19 RBC tüpünde tespit edilmediği hâlde WBC tüpünde PNH klonu bulunan bir vaka örneği (Beckman Coulter DxFLEX'ten elde edilen veriler).



11. Analitik performans

Özgüllük

Proaerolysin Alexa Fluor® 488, insan hücrelerindeki yüzey membran proteinlerinin GPI çapalarına özel olarak bağlanan floresan etiketli bakteriyel aerolizin türüdür (1, 2, 5, 8).

SY11B5 antikor, temel olarak monositler ve granüositler üzerinde ifade edilen CD157 proteininin CD157 antijeni üzerindeki bir ekstraselüler epitopu tanıır. Antikoru özgülüğü HCDM Kurulu tarafından onaylanmıştır (HLDA X atölyesi).

2D1 antikor, insan CD45 (Lökosit Ortak Antijeni) antijeninin tüm lökosit izoformlarını tanıır. Antikoru özgülüğü HCDM Kurulu tarafından onaylanmıştır (HLDA III atölyesi).

10.1 antikor, monositlerde ifade edilen insan CD64 antijenini tanıır. Antikoru özgülüğü HLDA atölyesi tarafından onaylanmıştır (HLDA III: WS Code M-250 atölyesi).

SN3 antikor granüositlerde ifade edilen CD24 antijeni ile tepkimeye girer. Antikoru özgülüğü HLDA atölyesi tarafından onaylanmıştır (HLDA IV: WS Code B 136; HLDA V: WS Code B CD24.7)

MEM-15 antikor, monositlerde ifade edilen bir GPI (glikozilfosfatidilinositol) bağı ekstraselüler membran glikoproteinini olan CD14 ile tepkimeye girer. Antikoru özgülüğü HCDM Kurulu tarafından onaylanmıştır (HLDA III: WS Code M 252; HLDA IV: WS Code M 113; HLDA IV: WS Code NL 90; HLDA IV: WS Code T 53; HLDA V: WS Code M MA086; HLDA VI: WS Code M MA94 atölyesi).

MEM-158 antikor, granüositlerin yüzeyinde güçlü bir şekilde ifade edilen CD15 ile tepkimeye girer. Antikoru özgülüğü HCDM Kurulu tarafından onaylanmıştır (HLDA VI: WS Code AS A053 atölyesi).

JC159 antikor, erken eritroblastlar, geç eritroblastlar, eritroblastlar ve olgun eritrositlerde ifade edilen bir sialoglikoprotein olan CD235a'nın (glikoforin A) ekstraselüler kısmının bir epitopunu tanıır.

MEM-43 antikor, tüm hematopoetik hücrelerin yüzeyinde ifade edilen (GPI) bağı glikoprotein olan CD59'deki (Protektin) iyi tanımlanmış epitop ile tepkimeye girer. Antikoru özgülüğü HLDA atölyesi tarafından onaylanmıştır (HLDA IV: WS Code NL 705; HLDA V: WS Code AS S013; HLDA V: WS Code BP BP345; HLDA V: WS Code T T-103 atölyesi).

MEM-75 antikor, olgunlaşmamış iRBC'lerde ifade edilen CD71 antijeninin ekstraselüler bir epitopu ile tepkimeye girer. Antikoru özgülüğü HLDA atölyesi tarafından onaylanmıştır (HLDA IV: WS Code A 45; HLDA V: WS Code T T-165 atölyesi).

Doğruluk

Yöntemin doğruluğu, PNH fenotipi olduğu doğrulanmış 13 hastanın paralel boyanmasıyla DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kiti cihazının akredite bir klinik laboratuvarın kurum içi yöntemiyle (farklı üreticilerin tek renkli konjuge antikorlarından oluşan ve BD FACSCanto™ II kullanılarak analiz edilen bir karışım) karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Doğrusal regresyon analizi parametreleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8 PNH fenotipi olduğu doğrulanmış hastalarda GPI eksikliği olan hücre popülasyonlarının göreceli sayıları için doğrusal regresyon analizi. BD FACSCanto™ II kullanılarak analiz edilen DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test kiti ile akredite bir klinik laboratuvarın kurum içi yönteminin karşılaştırılması.

PNH fenotipi	n	Eğim	Kesişme Noktası	R ²	Aralık [%]
CD59- CD235a+ Tip III eritrositleri	13	0,99	-0,026	1,00	1,28 – 83,79
CD59- CD235a+ Tip III iRBC	13	0,99	-0,384	1,00	5,97 – 97,78
CD59- CD235a+ Tip II eritrositleri	13	1,00	-0,059	1,00	0,13 – 89,92
CD59- CD235a+ Tip II iRBC	13	0,98	0,141	1,00	0,33 – 74,67
CD157- GPI çapası- CD64+ monositler	13	1,00	0,060	1,00	2,07 – 99,95
CD157- GPI çapası- CD15+ nötrofiller	13	0,99	0,294	1,00	0,80 – 99,82
CD14- GPI çapası- CD64+ monositler	13	Belirlenmemiş			2,04 – 99,96
CD14- CD157- CD64+ monositler	13	Belirlenmemiş			2,17 – 99,96
CD24- CD157- CD15+ nötrofiller	13	Belirlenmemiş			0,80 – 99,83
CD24- GPI çapası- CD15+ nötrofiller	13	Belirlenmemiş			0,81 – 99,80

n = kan örneklerinin sayısı

Tespit sınırı

Tespit sınırı (LOD) hedef popülasyonlardan her biri için (bkz. Tablo 5) 25 sağlıklı kan donöründen elde edilen sonuçların ortalama değeri olarak belirlenmiş ve 4 farklı akış sitometresi platformu için ortalamadan üç standart sapma eklenerek artırılmıştır (Tablo 9, 10, 11 ve 12).

Tablo 9 BD FACSLytic™ akış sitometresinde toplanan her PNH fenotipi için DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kiti LOD değerleri.

PNH fenotipi	BD FACSLytic™				
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	LOD (Ortalama + 3*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay toplandı; min. %80 singlet RBC olayları)*					
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	25	0,003	0,001	1.000.000 olay başına 5 – 48 olay	%0,005
CD59- Tip II ve Tip III RBC	25	0,054	0,061	3.000 iRBC başına 0 – 5 olay	%0,240
WBC Tüpü (50.000 nötrofil ve 10.000 monosit toplandı)					
CD14- CD157- Monositler	25	0,076	0,041	10.000 Monosit başına 2 – 24 olay	%0,20
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,021	0,018	10.000 Monosit başına 0 – 5 olay	%0,08
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,014	0,020	10.000 Monosit başına 0 – 4 olay	%0,07
CD157- CD24- Nötrofiller	25	0,006	0,006	50.000 Nötrofil başına 0 – 10 olay	%0,02
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	25	0,006	0,008	50.000 Nötrofil başına 0 – 15 olay	%0,03
GPI çapası- CD157- Nötrofiller	25	0,002	0,002	50.000 Nötrofil başına 0 – 4 olay	%0,01

DİKKAT*: Sıvı antikor karışımında analiz için minimum %98 singlet olayı tavsiye edilir ⁽²⁴⁾. DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kitinde kurutulmuş bir antikor karışımı, genellikle daha düşük singlet olay frekansına izin verir ve %98 singlet frekansına ulaşılabilir.

Tablo 10 BD FACSCanto™ II akış sitometresinde toplanan her PNH fenotipi için DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kiti LOD değerleri.

PNH fenotipi	BD FACSCanto™ II				
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	LOD (Ortalama + 3*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay toplandı; min. %80 singlet RBC olayları)					
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	25	0,0006	0,0004	1.000.000 olay başına 1 – 12 olay	%0,002
CD59- Tip II ve Tip III iRBC	25	0,0657	0,0847	1.000 iRBC başına 0 – 5 olay	%0,320
WBC Tüpü (50.000 nötrofil ve 10.000 monosit toplandı)					
CD14- CD157- Monositler	25	0,085	0,035	10.000 Monosit başına 2 – 16 olay	%0,19
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,086	0,096	10.000 Monosit başına 0 – 3 olay	%0,04
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,084	0,019	10.000 Monosit başına 0 – 7 olay	%0,06
CD157- CD24- Nötrofiller	25	0,004	0,052	50.000 Nötrofil başına 0 – 8 olay	%0,02
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	25	0,006	0,010	50.000 Nötrofil başına 0 – 16 olay	%0,03
GPI çapası- CD157- Nötrofiller	25	0,002	0,002	50.000 Nötrofil başına 0 – 4 olay	%0,01

Tablo 11 Beckman Coulter Navios EX akış sitometresinde toplanan her PNH fenotipi için DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kiti LOD değerleri.

PNH fenotipi	Beckman Coulter NAVIOS EX				
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	LOD (Ortalama + 3*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay toplandı; min. %80 singlet RBC olayları)					
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	25	0,007	0,007	1.000.000 olay başına 4 – 236 olay	%0,029
CD59- Tip II ve Tip III iRBC	25	0,087	0,100	1.000 iRBC başına 0 – 6 olay	%0,388
WBC Tüpü (50.000 nötrofil ve 10.000 monosit toplandı)					
CD14- CD157- Monositler	25	0,062	0,027	10.000 Monosit başına 0 – 23 olay	%0,14
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,024	0,006	10.000 Monosit başına 0 – 10 olay	%0,10
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,007	0,011	10.000 Monosit başına 0 – 6 olay	%0,04
CD157- CD24- Nötrofiller	25	0,012	0,015	50.000 Nötrofil başına 0 – 21 olay	%0,06
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	25	0,005	0,005	50.000 Nötrofil başına 0 – 6 olay	%0,02
GPI çapası- CD157- Nötrofiller	25	0,002	0,002	50.000 Nötrofil başına 0 – 5 olay	%0,01

Tablo 12 Beckman Coulter DxFLEX akış sitometresinde toplanan her PNH fenotipi için DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kiti LOD değerleri.

PNH fenotipi	Beckman Coulter DxFLEX				
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	LOD (Ortalama + 3*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay toplandı; min. %80 singlet RBC olayı)					
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	25	0,015	0,012	1.000.000 olay başına 5 – 48 olay	%0,049
CD59- Tip II ve Tip III iRBC	25	0,106	0,152	1.000 iRBC başına 0 – 5 olay	%0,562
WBC Tüpü (50.000 nötrofil ve 10.000 monosit toplandı)					
CD14- CD157- Monositler	25	0,092	0,068	10.000 Monosit başına 0 – 27 olay	%0,30
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,053	0,040	10.000 Monosit başına 0 – 16 olay	%0,17
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,005	0,009	10.000 Monosit başına 0 – 1 olay	%0,03
CD157- CD24- Nötrofiller	25	0,010	0,008	50.000 Nötrofil başına 0 – 14 olay	%0,03
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	25	0,008	0,006	50.000 Nötrofil başına 0 – 10 olay	%0,02
GPI çapası- CD157- Nötrofiller	25	0,002	0,002	50.000 Nötrofil başına 0 – 3 olay	%0,01

Miktar tayini limiti

Miktar tayini alt limiti (LLOQ), taze bir PNH örneği ile taze bir normal kan örneğinin seri seyreltilmesi (1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000) ile belirlenmiş ve BD FACSLyric™ ve Beckman Coulter DxFlex akış sitometreleri kullanılarak yapılan üç kopya boyama ve analiz ile değerlendirilmiştir. LLOQ için hassasiyet kriteri olarak maksimum %10 CV seçilmiştir.

Tablo 13 BD FACSLyric™ akış sitometresinde toplanan DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kiti LLOQ frekans değerleri.

PNH fenotipi	Seyreltme	PNH hücre sayısı	LLOQ	CV
CD59- Tip II ve Tip III RBC'ler	1:10.000	101	0,029 %	3,9 %
CD157- CD14- Monositler	1:10.000	28	0,677 %	2,3 %
GPI çapası- CD14- Monositler	1:10.000	7	0,130 %	7,7 %
GPI çapası- CD157- Monositler	1:10.000	2	0,018 %	9,9 %
CD157- CD24- Nötrofiller	1:10.000	3	0,012 %	3,6 %
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	1:10.000	1	0,009 %	8,7 %
GPI çapası- CD157- Nötrofiller	1:10.000	1	0,010 %	1,2 %

Tablo 14 Beckman Coulter DxFLEX akış sitometresinde toplanan DryFlowEx PNH Yüksek Hassasiyetli Test Kiti LLOQ frekans değerleri.

PNH fenotipi	Seyreltme	PNH hücre sayısı	LLOQ	CV
CD59- Tip II ve Tip III RBC'ler	1:10.000	101	0,005 %	9,1 %
CD157- CD14- Monositler	1:10.000	22	0,143 %	4,0 %
GPI çapası- CD14- Monositler	1:10.000	4	0,026 %	2,2 %
GPI çapası- CD157- Monositler	1:10.000	11	0,068 %	5,9 %
CD157- CD24- Nötrofiller	1:10.000	29	0,024 %	4,2 %
GPI çapası- CD24- Nötrofiller	1:10.000	8	0,007 %	7,1 %
GPI çapası- CD157- Nötrofiller	1:10.000	9	0,007 %	8,5 %

NOT: Akış sitometrisi analizi için yazılım sürümünü içeren aşağıdaki akış sitometreleri kullanıldı:

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

Ölçülen verilerin değerlendirilmesi için aşağıdaki analiz platformu kullanıldı:
FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - sürüm 10.9.0

12.Klinik performans

GPI eksikliğine sahip hastalar

Hem sağlıklı ⁽⁶⁾ hem de onaylanmış GPI eksikliği olan ⁽¹³⁾ hastalar olmak üzere 19 hastadan bir klinik alanda klinik veriler toplanmıştır. Klinik performans, DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti cihazının akredite bir klinik laboratuvarın kurum içi yöntemiyle (farklı üreticilerin tek renk konjuge antikorlarından oluşan ve BD FACSCanto™ II kullanılarak analiz edilen bir karışım) karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

Hastalardaki GPI eksikliği, GPI eksikliği olan hücreler (PNH klonları) tespit edilerek kullanılan yöntem açısından değerlendirilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti cihazının klinik performansı

		Akredite klinik laboratuvarın kurum içi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen GPI eksikliği değerlendirmesi	
		GPI eksikliği	Normal durum
DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit cihazı kullanılarak GPI eksikliği değerlendirilmesi	GPI eksikliği	13 hasta	0 hasta
	Normal durum	0 hasta	6 hasta

13.Beklenen değerler

Referans Aralığı

Normal popölasyonda GPI eksikliği saptanmaz ve tüm PNH fenotip yüzdelik değerlerinin Assay Cut-off (LOD) değerinden daha düşük olması beklenir ⁽⁶⁾.

14.Kısıtlamalar

Anemi gibi belirli hastalık türlerinde kullanım açısından herhangi bir sınırlama yoktur.

GPI eksikliği raporlaması, yayınlanan mevcut güncel yönergeler doğrultusunda sınırlıdır ⁽⁶⁾.

PNH klonu lenfositlerde tespit edilmez çünkü nötrofillerde ve monositlerde olgun lenfositlerden daha sık görülür. Bu da lenfoid hücrelerin uzun ömürlü olduğunu ve PNH klonlarının oluşmasından veya genişlemesinden önce var olabileceğini ileri sürer.

15.Referanslar

- 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 Lecoeur, 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.Güvenlik ve performans özeti

Güvenlik ve performans özeti <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home> adresindeki Eudamed veritabanında mevcut olacaktır. O zamana kadar güvenlik ve performans özeti talep üzerine temin edilebilir.

17.Üçüncü Taraf Ticari Markaların Kullanımı

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™ ve FlowJo™; Becton, Dickinson and Company'nin tescilli ticari markalarıdır. Cy™; Cytiva'nın tescilli ticari markasıdır. VenturiOne®, Applied Cytometry'nin tescilli ticari markasıdır. Infinicyt™, Cytognos S.L.'nin tescilli ticari markasıdır. SPHERO™ COMPTrol, Spherotech Inc. şirketinin tescilli ticari markasıdır.

18.Revizyon Geçmişi

Versiyon 4, ED7750_IFU_v4

- 1) "Numune" bölümü güncellendi.
- 2) Bölüm 10'daki uyarılar güncellendi.
- 3) Bölüm 10'da, şekiller de dahil olmak üzere "PNH RBC 3-color tüp" ve "PNH WBC 7-color tüp" bölümleri güncellendi.
- 4) Bölüm 10 "Dahili Kontroller" bölümü eklendi.

5) "Analitik sonuçların hesaplanması ve yorumlanması" bölümüne dikkat kısmı eklendi.

6) "GPI eksikliği raporlama algoritması kuralları" bölümü güncellendi.

7) Bölüm 11 "Analitik performans" bölümü güncellendi.

8) "Sınırlamalar" bölümü güncellendi.

9) "Referanslar" bölümündeki madde numaralandırması düzeltildi.

19.Üretici

EXBIO Praha, a.s.

Nad Safinou II 341

25250 Vestec

Çek Cumhuriyeti

İletişim Bilgileri

info@exbio.cz

technical@exbio.cz

orders@exbio.cz

www.exbio.cz

20.Yetkili Temsilciler

N/A

NOT: Cihaza ilişkin olarak meydana gelen herhangi bir ciddi olay üreticiye ve yerel yetkili makama bildirilmelidir.