

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti

25 test | Kat. No. ED7750

IVD CE 2265

Kullanım Kılavuzu (TR)

Versiyon: ED7750_IFU_v2_TR

Yayın Tarihi: 25/10/2024

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 nötrofil granüositlerdeki 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 nötrofil granüositler 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	H315: Ciltte tahrişe neden olur. H317: Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir. H319: Gözlerde ciddi tahrişe neden olur. 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. H302 + H312 + H332: Yutulması, ciltle temas etmesi veya solunması durumunda sağlığa zararlıdır.
P ifadeleri	P201: Kullanmadan önce özel talimatları edinin. P260: Buharını solumayın. P264: Kullandıktan sonra ellerinizi ve vücudunuzun açıkta kalan kısımlarını iyice yıkayın. P280: Koruyucu eldiven/göz koruması/yüz koruması kullanın. P301 + P312: YUTULMASI DURUMUNDA: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHİR MERKEZİNE/doktora başvurun. P302 + P352: CİLT İLE TEMAS ETMESİ DURUMUNDA: Bol su ve sabunla yıkayın. P305 + P351 + P338: GÖZLE TEMAS ETMESİ DURUMUNDA: Birkaç dakika boyunca suyla iyice durulayın. Varsa ve çıkarması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulama işlemine devam edin. P308 + P313: Maruz kalınırsa veya maruz kalındığından endişelenilirse: Tıbbi tavsiye/müdahale alın. P314: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız tıbbi tavsiye/müdahale alın. P333 + P313: Ciltte tahriş veya kızarıklık oluşursa: Tıbbi tavsiye/müdahale alın. P362 + P364: Kirlenen giysileri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın.

Ürünün içerdığı 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 ⁽²⁾.

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

Kan örneğini toplandıktan sonra en geç 48 saat içinde işleme alın. Örneği laboratuvar sıcaklığında (20-25 °C) saklayın. Örneği buzdolabında muhafaza etmeyin.

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, 26
Bilirubin (sarılık)	Bilirubin, yüksek otofloresansı nedeniyle	13, 15, 19

(konjuge olmayan)	hücrelerin floresan arka planını artırır.	
Hücre debris (lizis sonrası)	Hücre kalıntıları, yanlış hücre sayımlarına neden olabilir ve cihaz içindeki antikoru tüketebilir.	12, 16
Eritrositler	Yetersiz lizis, numunede bulunan kırmızı kan hücreleri hatalı hücre sayımına neden olabilir.	17
Hemoglobin	Hemolize numuneler güvenilir olmayan sonuçlar verebilir.	14
İnsan anti-murin antikorları	Cihaz işlevselliğini (hücre yüzeyi antijenlerine bağlanma kabiliyeti) etkileyebilir.	11, 21, 22, 23, 24, 25
İmmünoglobülinler	Lenfosit alt küme sayısını etkileyebilir.	12
Romatoid faktörler	RF'nin varlığı MIA (multipleks immünolojik testler) ile etkileşime girer.	18
Trigliseridler	Dolaşımdaki yüksek lipid seviyeleri, belirli kan hücresi popülasyonlarının akış sitometrisi analizini etkileyebilir.	20

Eksojen Interferans

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 ⁽²⁷⁾. Öte yandan, PNH'nin neden olduğu ekstrasvasküler hemoliz yaşayan hastalarda, hızlı eritrosit kaybına bağlı olarak iRBC sayısı artış gösterir ⁽²⁸⁾. 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 antikorunu 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 nötrofil granülositler 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 reaktifle 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 $300 \times g$ '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 rafına doğru kaydırarak lekeli örnekteki 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 reaktifle 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.

Boyali 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.

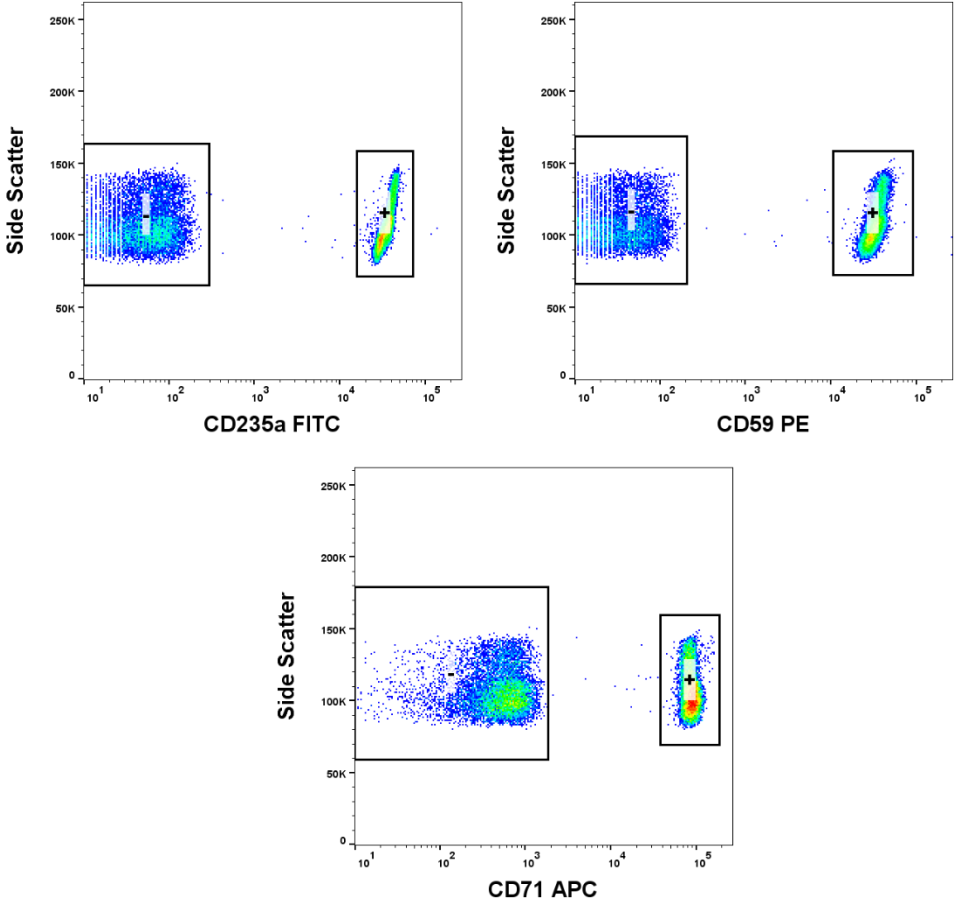
Gerekli ekipman başlıklı Bölüm 6'daki florokromların eksitasyon ve emisyon özelliklerine uygun lazerler ve floresan dedektörleri için üreticinin sitometre spesifikasyonlarına bakın.

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 "dengelencek florokrom" noktasal grafiğinde görselleştirin. Pozitif (+) ve negatif (-) sitometri dengeleme partikülleri için geçitleri Şekil 1'de gösterildiği gibi ayarlayın.

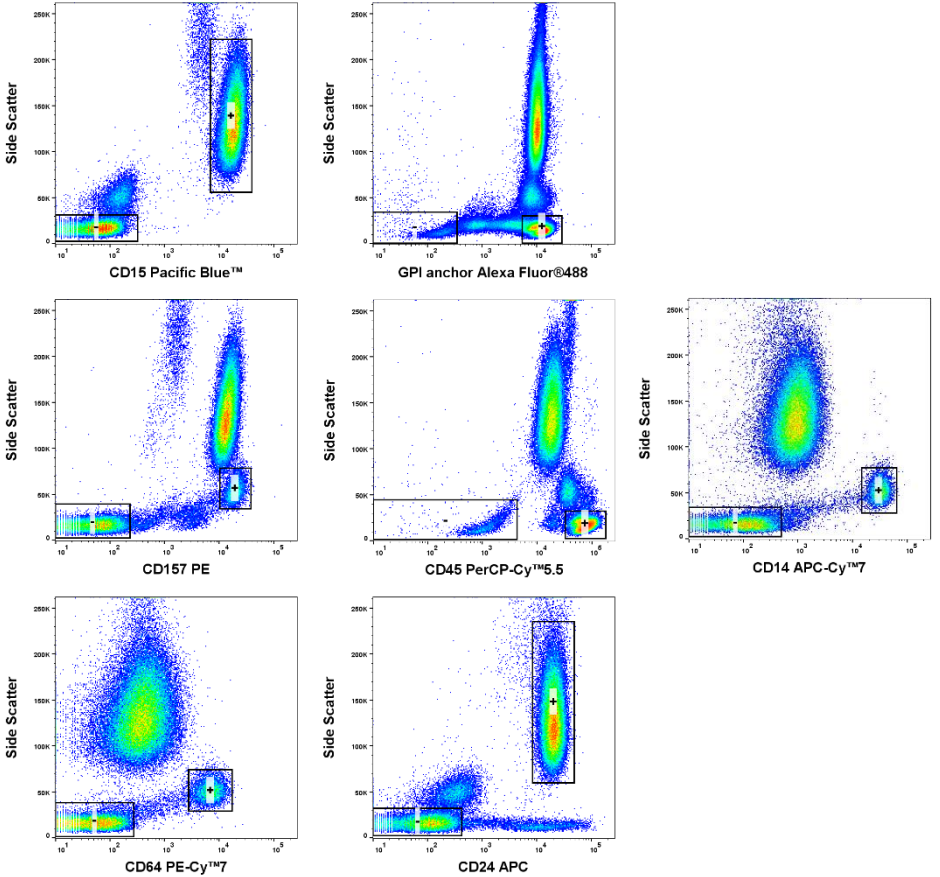
Şekil 1 Dengeleme tüplerindeki pozitif (+) ve negatif (-) sitometri dengeleme partiküllerinin tanımlanması (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



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.

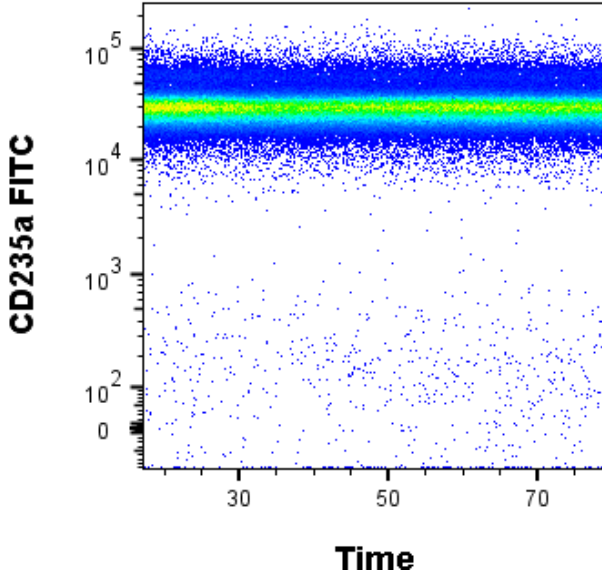
Şekil 2 Dengeleme tüplerindeki en pozitif (+) ve en negatif (-) olayların tanımlanması (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



PNH RBC 3-color t p (Kırmızı  eritli)

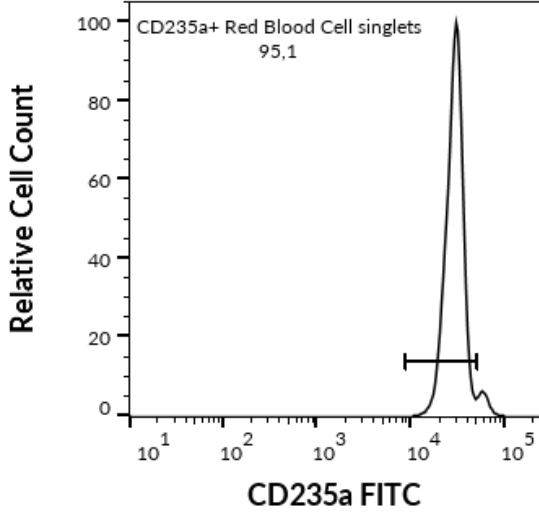
Seyreltilmiş kan örneğindeki düşük iRBC sayısı nedeniyle analiz için 500.000 – 1.500.000 eritrosit  rneęi alın. 500.000'den fazla örnek alınması uzun alım sürelerine neden olur. Bu, antikör-antijen bağlayıcı kompleks dengesini ve CD235a FITC floresansının azalmasını etkileyebilir. Toplama süresi boyunca floresan yoğunluğunun stabilitesini sürekli takip edin ( ekil 3).

Şekil 3 CD235a FITC ve Zaman noktasal grafiğinde elde edilen tüm olaylar (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



Dengelenmiş verileri, X ekseninin FITC kanalındaki floresan yoğunluğunu belirttiği bir histogram şeklinde görselleştirin. "CD235a+ RBC singletleri" geçidini ayarlayın (Şekil 4).

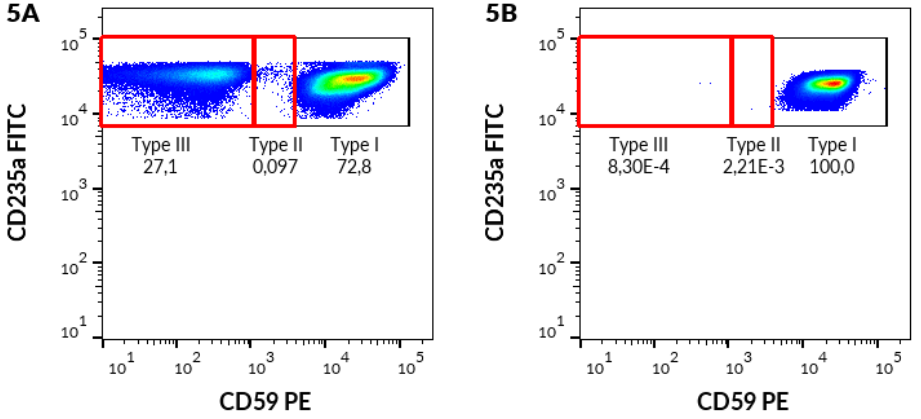
Şekil 4 CD235a+ RBC singletlerinin grafiği (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



Eritrositler

CD235a+ RBC singletlerini, CD235a FITC ve CD59 PE noktasal grafiğinde görselleştirin. Üç uygun geçit kullanarak olayları üç popülasyona ayırın (Şekil 5) ve Tip I, Tip II ve Tip III bölgelerindeki olayların yüzdesini hesaplayın.

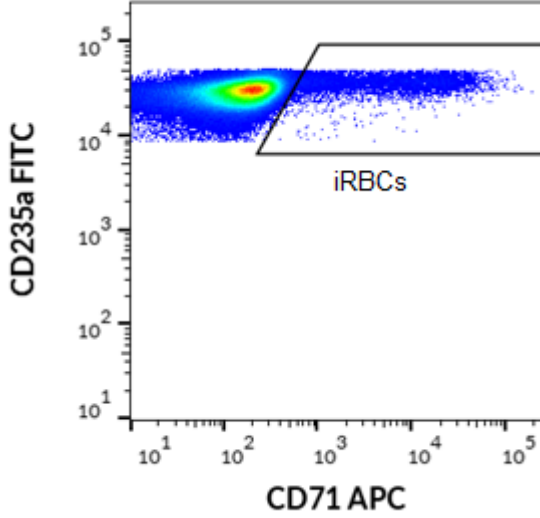
Şekil 5 CD59 PE ve CD235a FITC noktasal grafiğinde CD235a+ RBC singletleri (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



iRBC (olgunlaşmamış eritrositler)

CD235a+ RBC singletlerini, CD235a FITC ve CD71 APC noktasal-grafiginde görselleştirin ve CD71+ iRBCleri ayırın (Şekil 6).

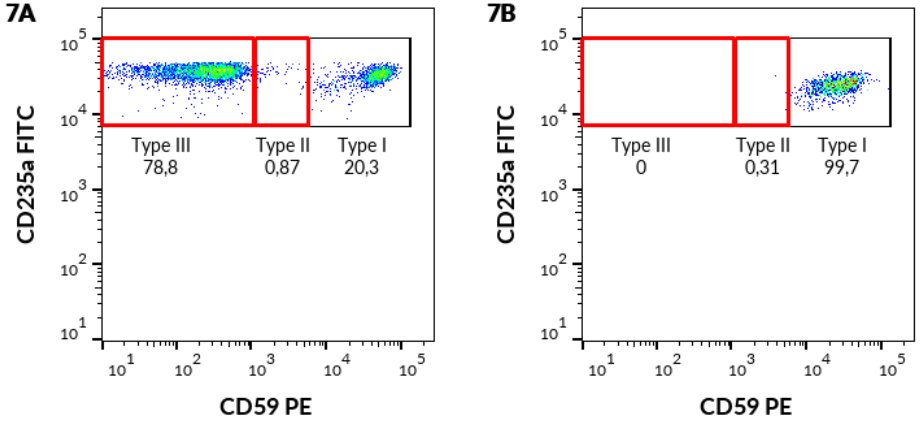
Şekil 6 CD71 APC ve CD235a FITC noktasal grafiğinde CD235a+ RBC singletleri. CD71+ iRBC grafiği (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



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

Şekil 7 CD59 PE ve CD235a FITC noktasal grafiğinde CD71+ iRBC (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).

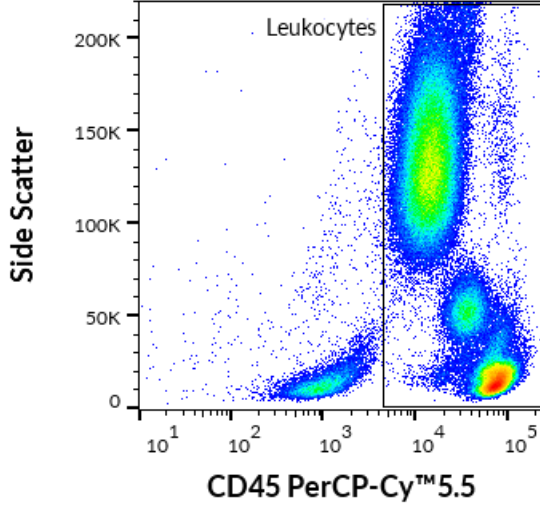
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



PNH WBC 7-color tüpü (Camgöbeği şeritli)

Analiz için en az 200.000 olay toplayın. 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.

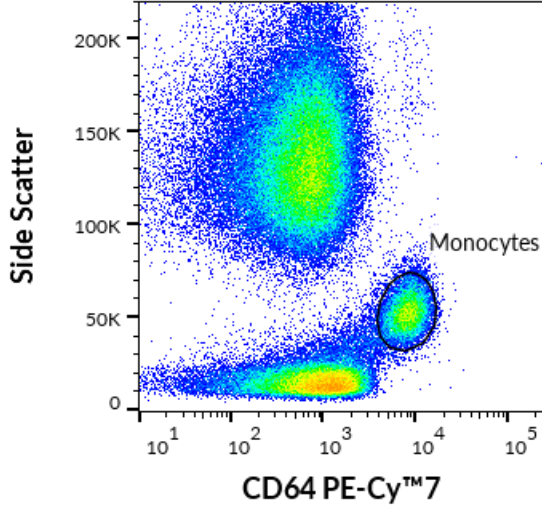
Şekil 8 CD45+ Lökositlerin Grafiği (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



Monositler

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

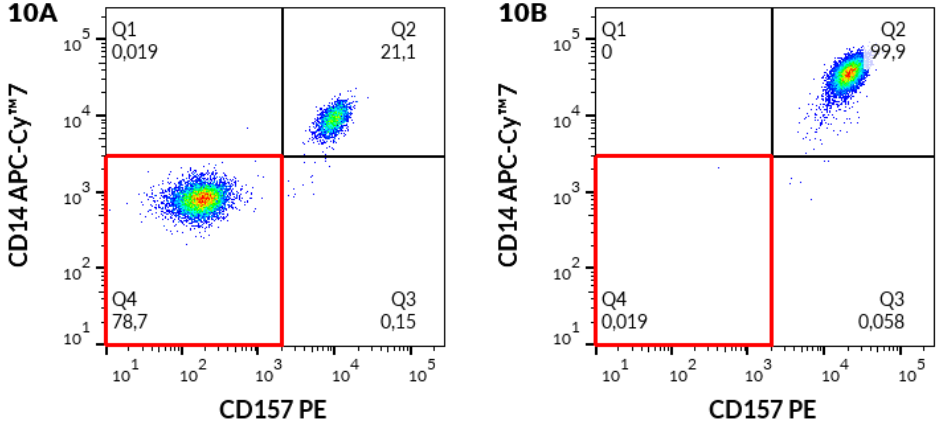
Şekil 9 Lökositlerdeki CD64+ Monositlerin Grafiği (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



CD157 PE ve CD14 APC-Cy™7 noktasal-grafiğindeki CD64+ Monositleri görselleştirin (Şekil 10). Uygun geçitleri ayarlayın ve Q4 çeyreğindeki CD157- CD14- popülasyon yüzdesini hesaplayın.

Şekil 10 CD157 PE ve CD14 APC-Cy™7 noktasal grafiğindeki CD64+ Monositleri (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).

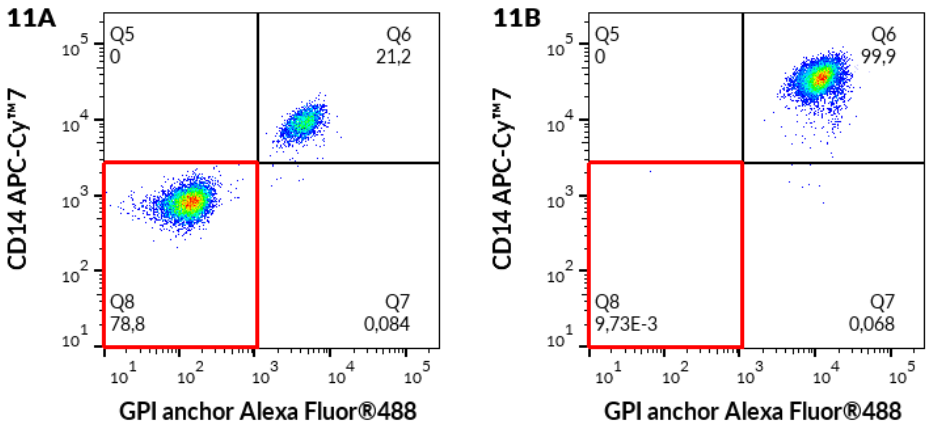
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



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

Şekil 11 Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI çapası) ve CD14 APC Cy™7 noktasal grafiğinde CD64+ Monositleri (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).

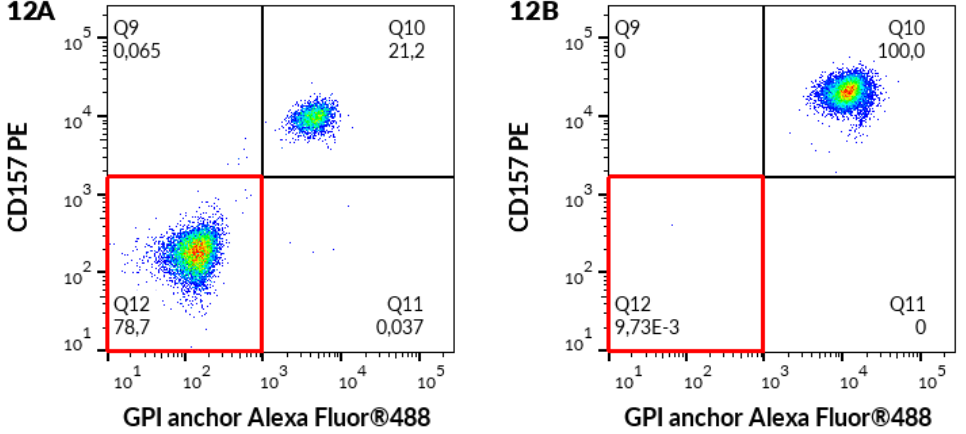
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Ardından aynı CD64+ monositleri, Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI çapası) ve CD157 PE noktasal-grafiginde görselleştirin (Şekil 12). Uygun geçitleri ayarlayın ve Q4 çeyreğindeki GPI çapası- CD157- popülasyonunun yüzdesini hesaplayın.

Şekil 12 Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI çapası) ve CD157 PE noktasal grafiğinde CD64+ Monositleri (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).

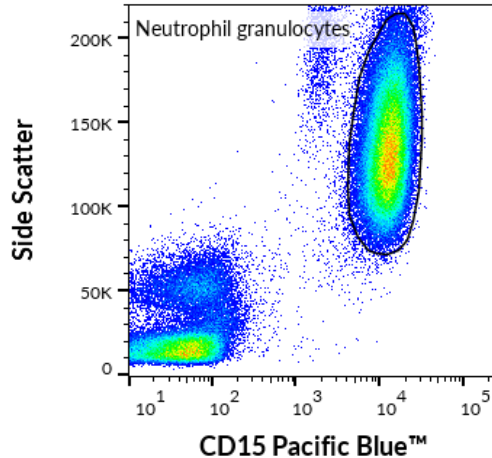
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Nötrofil Granülositleri

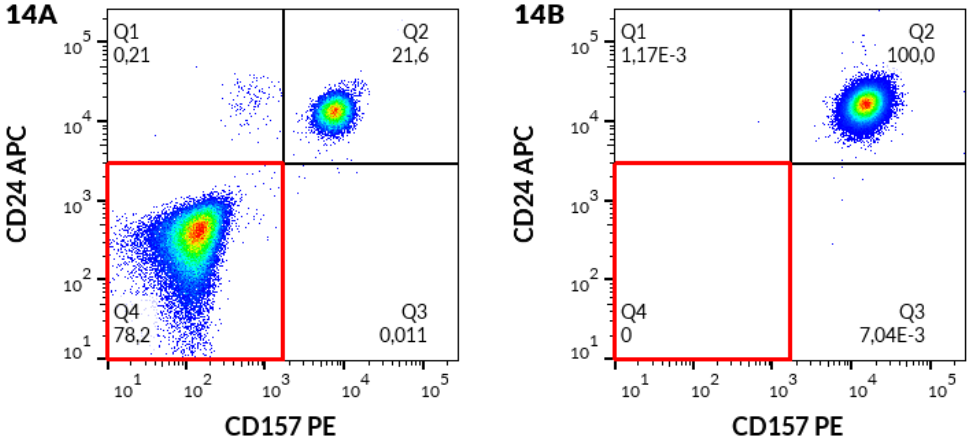
CD45+ lökositleri yana-saçılım ve CD15 Pacific Blue™ noktasal-grafiginde görselleştirin ve CD15+ nötrofil granülositleri Şekil 13'te gösterildiği gibi ayırın.

Şekil 13 Lökositlerdeki CD15+ Nötrofil Granülositlerin Grafiği (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).



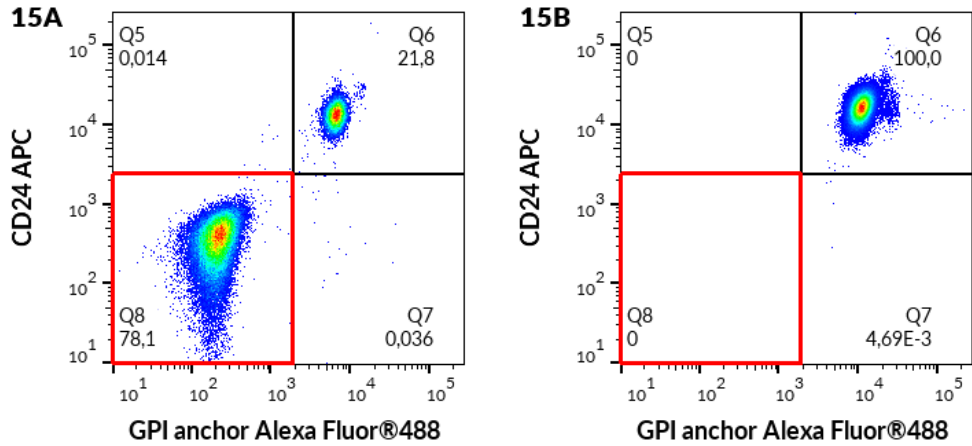
CD15+ nötrofil granüositlerini CD157 PE ve CD24 APC noktasal-grafiğinde Şekil 14'te gösterildiği gibi görselleştirin. Uygun geçitleri ayarlayın ve Q4 çeyreğindeki CD157- CD24- popülasyon yüzdesini hesaplayın.

Şekil 14 CD157 PE ve CD24 APC noktasal-grafiğinde CD15+ Nötrofil granüositleri (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



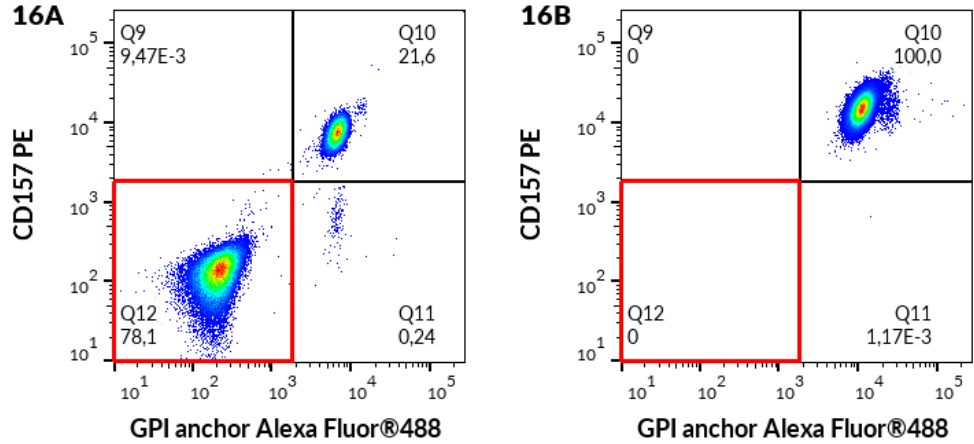
Ardından aynı CD15+ nötrofil granüositlerini Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI çapası) ve CD24 APC noktasal-grafiğinde görselleştirin, uygun geçitleri ayarlayın ve Q4 çeyreğindeki GPI çapası- CD24- popülasyonunun yüzdesini Şekil 15'te gösterildiği gibi hesaplayın.

Şekil 15 Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI çapası) ve CD24 APC noktasal-grafiğinde CD15+ Nötrofil granüositleri (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



Ardından aynı CD15+ nötrofil granülositlerini Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI çapası) ve CD157 PE noktasal-grafiginde görselleştirin, uygun geçitleri ayarlayın ve Q4 çeyreğindeki GPI çapası- CD157- popülasyonunun yüzdesini Şekil 16'da gösterildiği gibi hesaplayın.

Şekil 16 Proaerolysin Alexa Fluor® 488 (GPI çapası) ve CD157 PE noktasal-grafiginde CD15+ Nötrofil granülositleri (BD FACSCanto™ II'de elde edilen veriler).
A) PNH klonu olan hasta; B) sağlıklı donör



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)
	Nötrofil Granülositleri	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 (eşik), 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- Nötrofil Granülositleri	0,02	0,02	0,06	0,03
GPI çapası- CD24- Nötrofil Granülositleri	0,03	0,03	0,02	0,02
GPI çapası- CD157- Nötrofil Granülositleri	0,01	0,01	0,01	0,01

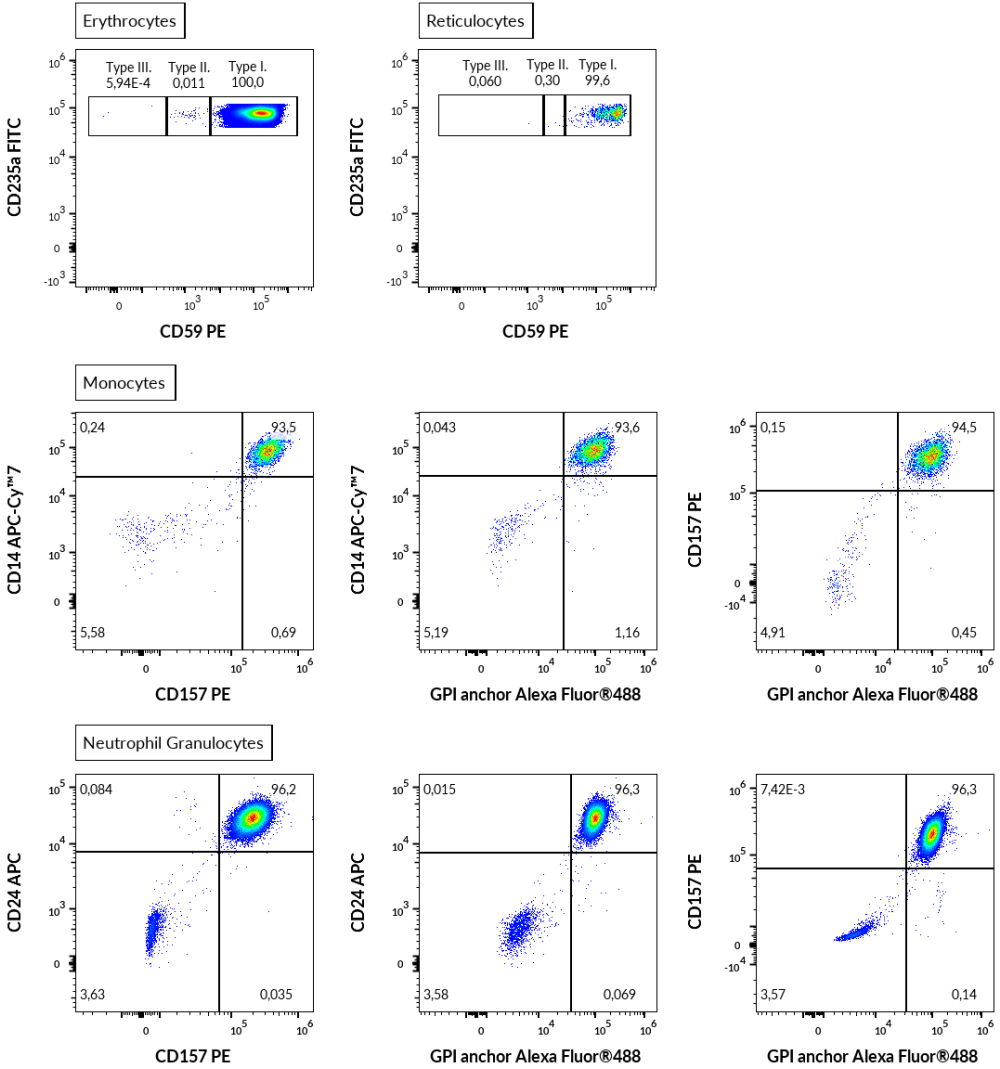
GPI eksikliği raporlama algoritması kuralları

1. GPI eksikliğine sahip ve hücre popülasyonu sıklığı Eşik değerinden (Tablo 6) **düşük** olan hastalarda sonuçlar şu şekilde raporlanmalıdır: **"granülositler, monositler, RBC'ler ve iRBCs GPI bağlı antijenlerin normal ekspresyonunu göstermektedir. PNH klonları tespit edilmemiştir"** ⁽¹⁾.
2. GPI eksikliğine sahip ve hücre popülasyonu sıklığı Eşik değerinden (Tablo 6) **yüksek** olan hastalarda sonuçlar şu şekilde raporlanmalıdır: **"granülositler, monositler, RBC'ler veya iRBCs kısmi veya tam GPI eksikliği gösterir"**. PNH klonları tespit edilmiştir.

DİKKAT: Klinik laboratuvar, Tablo 8 – 11'da belirtilenden farklı bir sitometre türü ve/veya markası kullanırken bir dizi normal hasta örneğinden yola çıkarak kendi tespit sınırı (LOD)/Eşik değerlerini belirlemelidir. (Analitik performans/Tespit sınırı/Test Eşiği başlıklı bölüm 11'e bakın).

3. PNH vakalarının çoğunda tüm WBC hedef hücre popülasyonlarında PNH klonu bulunur^(4, 6, 7, 8). WBC PNH klonları kümelenmiş ve rastgele ikili negatif olaylardan daha az saçılmış görünür.
4. Bazı durumlarda, WBC tüpünde bir PNH klonunun bulunduğu tespit edilebilirken, **Şekil 17'de** gösterildiği gibi bir RBC tüpünde tespit edilemeyebilir. Bu durumda, **GPI eksikliği raporlama algoritmasının 2. kuralı** uyarınca bir PNH klonunun var olduğu rapor edilmelidir.
5. Herhangi bir PNH klonu tespit edilirse her zaman ana hücre popülasyonlarındaki tüm PNH klon fenotiplerinin (Tablo 6) yüzdesini rapor edin. Monositler, nötrofil granükositlerden daha büyük PNH klonu boyutuna sahip olabilir⁽²⁾.
6. 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⁾. Aynısı nötrofil PNH fenotipleri için de geçerlidir.

Şekil 17 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 granülositler üzerinde ifade edilen CD157 antijeninin 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 granülositlerde 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) bağlı 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, granülositlerin 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) bağlı 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 fenotipinin bulunduğu doğrulanmış 13 hastanın paralel şekilde boyanarak DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti cihazının akredite bir klinik laboratuvarın kurum içi yöntemiyle karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Doğrusal regresyon analizi parametreleri Tablo 7'da verilmiştir.

Tablo 7 PNH fenotiplerinin bulunduğu doğrulanmış hastalarda GPI eksikliği olan hücre popülasyonlarının (PNH fenotipleri) göreceli sayıları için yapılan doğrusal regresyon analizi (DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay kitinin akredite bir klinik laboratuvarın kurum içi yöntemiyle karşılaştırılması (farklı üreticilerin tek renk konjuge antikorlarından oluşan bir karışımı ve BD FACSCanto™ II kullanılarak analiz edilmiştir))

Lenfosit Alt Kümesi	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 limiti / Miktar tayini limiti / Assay Cut-off

Tespit sınırı (LOD) hedef popülasyonların her biri için (Tablo 5'e bakın) 25 sağlıklı kan donöründen elde edilen sonuçların ortalama değeri olarak belirlenmiş, 4 farklı akış sitometresi platformu için ortalama üç standart sapma eklenerek artırılmış ve Tablo 8, 9, 10 ve 11'da Test Eşiği olarak ifade edilmiştir.

DİKKAT: Klinik laboratuvar, Tablo 8 – 11’da belirtilenden farklı bir sitometre türü ve/veya markası kullanırken bir dizi normal hasta örneğinden yola çıkarak kendi tespit sınırını (LOD)/Eşik değerlerini belirlemelidir.

Tablo 8 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti BD FACSLytic™ akış sitometresinde elde edilen PNH fenotipi insidansı ve LOQ ile birlikte her bir PNH fenotipine ilişkin Eşik değerleri.

PNH fenotipi	BD FACSLytic™					
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	Eşik (Ortalama + 3*SD)	LOQ (Ortalama + 10*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay elde edildi; min. %80 singlet RBC olayı)						
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	25	0,003	0,001	1.000.000 olay başına 5 – 48 olay (ortalama 25 olay)	%0,005	%0,012
CD59- Tip II ve Tip III RBC	25	0,054	0,061	3.000 iRBC başına 0 – 5 olay (ortalama 2 olay)	%0,240	%0,660
WBC Tüpü (200.000 olay elde edildi)						
CD14- CD157- Monositler	25	0,076	0,041	10.000 Monosit başına 2 – 24 olay (ortalama 8 olay)	%0,20	%0,49
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,021	0,018	10.000 Monosit başına 0 – 5 olay (ortalama 2 olay)	%0,08	%0,20
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,014	0,020	10.000 Monosit başına 0 – 4 olay (ortalama 1 olay)	%0,07	%0,21
CD157- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,006	0,006	100.000 Nötrofil başına 0 – 20 olay (ortalama 5 olay)	%0,02	%0,07
GPI çapası- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,006	0,008	100.000 Nötrofil başına 0 – 29 olay (ortalama 6 olay)	%0,03	%0,09
GPI çapası- CD157- Nötrofil Granülositleri	25	0,002	0,002	100.000 Nötrofil başına 0 – 8 olay (ortalama 2 olay)	%0,01	%0,02

Tablo 9 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti BD FACSCanto™ II akış sitometresinde elde edilen PNH fenotipi insidansı ve LOQ ile birlikte her bir PNH fenotipine ilişkin Eşik değerleri.

PNH fenotipi	BD FACSCanto™ II					
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	Eşik (Ortalama + 3*SD)	LOQ (Ortalama + 10*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay elde edildi; min. %80 singlet RBC olayı)						
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	25	0,0006	0,0004	1.000.000 olay başına 1 – 12 olay (ortalama 6 olay)	%0,002	%0,004
CD59- Tip II ve Tip III iRBC	25	0,0657	0,0847	1.000 iRBC başına 0 – 5 olay (ortalama 1 olay)	%0,320	%0,913
WBC Tüpü (200.000 olay elde edildi)						
CD14- CD157- Monositler	25	0,085	0,035	10.000 Monosit başına 2 – 16 olay (ortalama 8 olay)	%0,19	%0,43
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,086	0,096	10.000 Monosit başına 0 – 3 olay (ortalama 1 olay)	%0,04	%0,10
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,084	0,019	10.000 Monosit başına 0 – 7 olay (ortalama 1 olay)	%0,06	%0,20
CD157- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,004	0,052	100.000 Nötrofil başına 0 – 17 olay (ortalama 5 olay)	%0,02	%0,06
GPI çapası- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,006	0,010	100.000 Nötrofil başına 0 – 32 olay (ortalama 6 olay)	%0,03	%0,10
GPI çapası- CD157- Nötrofil Granülositleri	25	0,002	0,002	100.000 Nötrofil başına 0 – 8 olay (ortalama 2 olay)	%0,01	%0,02

Tablo 10 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti Beckman Coulter Navios EX akış sitometresinde elde edilen PNH fenotipi insidansı ve LOQ ile birlikte her bir PNH fenotipine ilişkin Eşik değerleri.

PNH fenotipi	Beckman Coulter NAVIOS EX					
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	Eşik (Ortalama + 3*SD)	LOQ (Ortalama + 10*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay elde edildi; min. %80 singlet RBC olayı)						
CD59- Tip II ve Tip III RCB'leri	25	0,007	0,007	1.000.000 olay başına 4 – 236 olay (ortalama 60 olay)	%0,029	%0,081
CD59- Tip II ve Tip III iRBC	25	0,087	0,100	1.000 iRBC başına 0 – 6 olay (ortalama 1 olay)	%0,388	%1,092
WBC Tüpü (200.000 olay elde edildi)						
CD14- CD157- Monositler	25	0,062	0,027	10.000 Monosit başına 0 – 23 olay (ortalama 6 olay)	%0,14	%0,33
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,024	0,006	10.000 Monosit başına 0 – 10 olay (ortalama 2 olay)	%0,10	%0,28
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,007	0,011	10.000 Monosit başına 0 – 6 olay (ortalama 1 olay)	%0,04	%0,12
CD157- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,012	0,015	100.000 Nötrofil başına 0 – 43 olay (ortalama 12 olay)	%0,06	%0,16
GPI çapası- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,005	0,005	100.000 Nötrofil başına 0 – 13 olay (ortalama 5 olay)	%0,02	%0,05
GPI çapası- CD157- Nötrofil Granülositleri	25	0,002	0,002	100.000 Nötrofil başına 0 – 10 olay (ortalama 2 olay)	%0,01	%0,03

Tablo 11 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kiti Beckman Coulter DxFLEX akış sitometresinde elde edilen PNH fenotipi insidansı ve LOQ ile birlikte her bir PNH fenotipine ilişkin Eşik değerleri.

PNH fenotipi	Beckman Coulter DxFLEX					
	n	Ortalama [%]	SD [%]	PNH fenotipi insidansı	Eşik (Ortalama + 3*SD)	LOQ (Ortalama + 10*SD)
RBC tüpü (1.000.000 olay elde edildi; 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 (ortalama 25 olay)	%0,049	%0,129
CD59- Tip II ve Tip III iRBC	25	0,106	0,152	1.000 iRBC başına 0 – 5 olay (ortalama 2 olay)	%0,562	%1,626
WBC Tüpü (200.000 olay elde edildi)						
CD14- CD157- Monositler	25	0,092	0,068	10.000 Monosit başına 0 – 27 olay (ortalama 10 olay)	%0,30	%0,77
GPI çapası- CD14- Monositler	25	0,053	0,040	10.000 Monosit başına 0 – 16 olay (ortalama 6 olay)	%0,17	%0,46
GPI çapası- CD157- Monositler	25	0,005	0,009	10.000 Monosit başına 0 – 1 olay (ortalama 1 olay)	%0,03	%0,10
CD157- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,010	0,008	100.000 Nötrofil başına 0 – 28 olay (ortalama 10 olay)	%0,03	%0,09
GPI çapası- CD24- Nötrofil Granülositleri	25	0,008	0,006	100.000 Nötrofil başına 0 – 20 olay (ortalama 8 olay)	%0,02	%0,06
GPI çapası- CD157- Nötrofil Granülositleri	25	0,002	0,002	100.000 Nötrofil başına 0 – 5 olay (ortalama 2 olay)	%0,01	%0,02

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 12).

Tablo 12 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⁾.

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

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

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

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

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

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

16. 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 2, ED7750_IFU_v2

- 1) Endojen ve eksojen etkileşimi eklendi.
- 2) "GPI eksikliği raporlama algoritması kuralları" bölümü güncellendi.
- 3) Bölüm 13. Beklenen değerler – küçük metin düzeltmeleri.
- 4) Referanslar güncellendi.
- 5) Bilgilendirilen Kuruluş Kimlik numarasının eklendi.
- 6) Bölüm 16 eklendi. Güvenlik ve performans özeti

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.