

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

25 testów | Nr kat. ED7750

IVD **CE** 2265

Instrukcja użycia (PL)

Wersja: ED7750_IFU_v4_PL

Data wydania: 13.03.2026 r.

Symbole stosowane w oznakowaniu urządzeń

IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Ograniczenie temperatury
CE 2265	Znak zgodności CE Numer identyfikacyjny organu notyfikowanego		Przechowywać poza zasięgiem światła słonecznego
	Producent		Utrzymywać w suchości Chronić przed deszczem
UDI	Unikalny identyfikator urządzenia		Ostrzeżenie
	Zapoznaj się z instrukcją użycia		Nie używać ponownie
	Zawiera ilość wystarczającą na <n> testów	TUBE	Zawiera <n> probówek do testu jednorazowego użytku
REF	Numer katalogowy	CONC 10x	Skoncentrowany roztwór (10x)
LOT	Kod partii	CONTENTS	Zawartość
	Termin przydatności do użycia	UKCA	Znak UKCA

1. Przeznaczenie

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit jest przeznaczony do wykrywania z dużą czułością i oznaczania liczby komórek z niedoborem glikozylo-fosfatydylo-inozytolu (GPI) w ludzkiej krwi pełnej za pomocą cytometrii przepływowej.

Co jest wykrywane i/lub mierzone

Urządzenie DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit wykrywa i zlicza komórki z niedoborem glikozylo-fosfatydylo-inozytolu (GPI) (klony PNH) jako procent:

- Komórek CD59 dim lub CD59- ze wszystkich erytrocytów (CD235a+)
- Komórek CD59 dim lub CD59- ze wszystkich iRBCs (CD235a+CD71+)
- Komórek CD14-, CD157- i zakotwiczonych w GPI ze wszystkich monocytów (CD45+CD64+)
- Komórek CD24-, CD157- i i zakotwiczonych w GPI ze wszystkich neutrofilii (CD45+CD15+)

Funkcja urządzenia

Urządzenie przeznaczone jest do diagnozowania i monitorowania pacjentów cierpiących lub podejrzewanych o napadową nocną hemoglobinurię (PNH) i zaburzenia pokrewne ⁽¹⁾.

Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego

Napadowa nocna hemoglobinuria (PNH) jest rzadkim zaburzeniem hematopoetycznym komórek macierzystych, które jest konsekwencją niezłśliwego klonalnego namnażania się komórek z somatyczną mutacją genu PIGA (ang. Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class A). Mutacje genu PIGA skutkują niezdolnością do ekspresji białek powierzchniowych komórek zakotwiczonych w glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI).

Urządzenie jest przeznaczone do wykrywania neutrofilii i monocytów z niedoborem GPI ⁽¹⁾ oraz erytrocytów z całkowitym (Typ III) i częściowym (Typ II) niedoborem GPI ^(2,3,4,5,6) w celu oceny wielkości klonu PNH.

Ponadto urządzenie wykrywa iRBCs z niedoborem GPI (nie dojrzale erytrocyty) u pacjentów poddawanych transfuzji krwi, gdy erytrocyty PNH są trudne do określenia ⁽⁷⁾.

Rodzaj testu

Nie zautomatyzowany

Ilościowy

Wymagany rodzaj próbki

Próbka ludzkiej pełnej krwi obwodowej z antykoagulantem (EDTA, heparyna, cytrynian) ⁽¹⁾

Populacja testowa

Pacjenci z:

- laboratoryjnymi markerami hemolizy, gdy wykluczono inne, częstsze przyczyny hemolizy,
- niewyjaśnionymi zakrzepami w młodym wieku,
- stwierdzoną zakrzepicą w nietypowym miejscu,
- wrodzoną lub nabytą niedokrwistością aplastyczną (AA),
- zespołem mielodysplastycznym (MDS),
- niewyjaśnioną cytopenią, w przypadku której AA lub MDS stanowią diagnostykę różnicową ⁽¹⁾

2. Użytkownik

Urządzenie jest przeznaczone wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego. Nie do badań przyłożkowych ani nie do samodzielnego wykonywania testów.

Wymagania dotyczące kwalifikacji

Docelowy użytkownik powinien posiadać najnowszą wiedzę specjalistyczną w zakresie analizy cytometrii przepływowej komórek ludzkich, standardowych technik laboratoryjnych, w tym umiejętności pipetowania oraz bezpiecznego i właściwego obchodzenia się z próbkami pobranymi z organizmu ludzkiego.

Docelowy użytkownik musi przestrzegać normy EN ISO 15189 lub innych norm krajowych jeśli takowe istnieją.

3. Zasada testu

Zasada testu opiera się na wykrywaniu kotwicy GPI i białek zakotwiczonych w GPI na powierzchni ludzkich komórek krwi. Zastosowane w teście przeciwciała monoklonalne i rekombinowana proaerolizyna są znakowane różnymi fluorochromami, które są wzbudzane wiązką laserową z cytometru przepływowego podczas pobierania wybarwionej próbki krwi. Późniejsza fluorescencja (emisja światła) każdego fluorochromu obecnego w pobranej komórce krwi jest zbierana i analizowana przez urządzenie. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do gęstości ekspresji antygeny w komórce, co pozwala na rozdzielenie różnych podzbiorów komórek.

4. Dostarczone odczynniki

Zawartość

Urządzenie DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, wystarczające do zbadania 25 pacjentów, dostarczane jest z następującymi odczynnikami:

PNH High-Sensitivity Assay (25 woreczków). Każdy woreczek składa się z 1 jednorazowej próbówki z korkiem oznaczonej kolorem (cyjanowy pasek)

PNH WBC 7-color (ED7750-1) i 1 jednorazowej kolorowej probówki z korkiem oznaczonej kolorem (czerwony pasek) **PNH RBC 3-color** (ED7750-2), zawierających wstępnie zmieszane kombinacje odczynników znakowanych fluorochromem, wysuszonych ze składnikami stabilizującymi jako warstwę na dnie probówek (12 x 75 mm), patrz tabela 1 i 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 butelka) zawierający 15 ml stężonego (10X) roztworu buforowego na bazie formaldehydu.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 woreczek) zawierający 10 zakorkowanych probówek jednorazowego użytku, z których każda zawiera pojedynczy odczynnik znakowany fluorochromem wysuszony ze składnikami stabilizującymi jako warstwę na dnie probówki (12 x 75 mm).

UWAGA: zestaw kompensacji PNH jest przeznaczony wyłącznie do konfiguracji kompensacji. Pojedyncze odczynniki znakowane fluorochromem (patrz tabela 1 i tabela 2) umożliwiają łatwą i dokładną procedurę kompensacji.

Skład

Tabela 1 Opis składników aktywnych PNH WBC 7-color

Antygen	Fluorochrom	Klon	Izotyp
Kotwica GPI (proaerolizyna)	Alexa Fluor®488	Nie dotyczy	Nie dotyczy
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

Tabela 2 Opis składników aktywnych PNH RBC 3-color

Antygen	Fluorochrom	Klon	Izotyp
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Materiały wymagane, nie będące w zestawie

Woda dejonizowana (do odczynników)

Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (1X PBS), pH 7,2 – 7,4

Cząstki kompensacyjne cytometrii przepływowej (zestaw Spherotech SPHERO™ COMPtrol, nr kat. CMIgP-50-3K lub równoważne cząstki kompensacyjne)

6. Wymagany osprzęt

Pipeta automatyczna z jednorazowymi końcówkami (100 µl – 5 ml) do pipetowania próbek i odczynników

Dozownik lub pipeta do płynów z jednorazowymi końcówkami (2 ml) do dozowania roztworu do lizy erytrocytów

Mieszadło wirowe

Stożkowe polipropylenowe probówki wirówkowe (15 ml lub 50 ml) do przygotowania próbek

Wirówka z odpowiednimi adapterami rotora do probówek okrągłodennych 12 x 75 mm

Cytometr przepływowy z trzema laserowymi źródłami wzbudzenia (488 nm, ~635 nm i 405 nm), detektorami rozpraszania, filtrami optycznymi i detektorami emisji odpowiednimi do zbierania sygnałów z fluorochromów przedstawionych w tabeli 3

Tabela 3 Charakterystyka widmowa fluorochromów zastosowanych w urządzeniu

Fluorochrom	Wzbudzenie [nm]	Emisja [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

UWAGA: urządzenie zostało przetestowane na cytometrach przepływowych BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Przechowywanie

Przechowywać w temperaturze 20–30°C.

Unikać długotrwałej ekspozycji na światło.

Utrzymywać w suchości.

UWAGA: produkt wrażliwy na wilgoć. Nie otwierać woreczka foliowego przed pierwszym użyciem.

Informacje na temat warunków przechowywania i stabilności roztworów roboczych (w stosownych przypadkach) znajdują się w punkcie 10. Procedura (Przygotowanie dostarczonych odczynników).

8. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia użytkowania

Klasyfikacja zagrożeń GHS

OSTRZEŻENIE: Lysing Solution (ED7750-3) zawiera formaldehyd (nr CAS 50-00-0) i metanol (nr CAS 67-56-1) w stężeniach sklasyfikowanych jako niebezpieczne.

Elementy etykiety	Hasło ostrzegawcze
	Niebezpieczeństwo
	
Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia	H302: Działa szkodliwie po połknięciu. H315: Działa drażniąco na skórę. H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H319: Działa drażniąco na oczy. H331: Działa toksycznie w następstwie wdychania. H335: Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. H341: Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne. H350: Może powodować raka. H371: Może powodować uszkodzenie narządów. H373: Może powodować uszkodzenie nerek poprzez długotrwałe lub narażenie powtarzane po połknięciu. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe.
Zwroty wskazujące środki ostrożności	P201: Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności. P260: Nie wdychać par. P280: Stosować rękawice ochronne/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P308+P313: W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P403+P233: Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.
--

Zapoznaj się z kartą charakterystyki (SDS) dostępną na stronie produktu pod adresem www.exbio.cz, aby uzyskać pełne informacje na temat zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne i mieszaniny zawarte w produkcie oraz jak należy się z nimi obchodzić i jak je utylizować.

Zagrożenie biologiczne

Ludzkie próbki biologiczne i próbki krwi oraz wszelkie materiały mające z nimi kontakt są zawsze uważane za materiały zakażne.

Stosować środki ochrony osobistej i bezpieczeństwa, aby uniknąć kontaktu ze skórą, oczami i błonami śluzowymi.

Postępować zgodnie ze wszystkimi obowiązującymi przepisami prawa, regulacjami i procedurami dotyczącymi obchodzenia się z materiałami zakaźnymi i ich usuwania.

Oznaki pogorszenia jakości

Normalny wygląd dostarczonego odczynnika to przezroczysta wysuszona warstwa na dnie próbówki. Nie używać odczynnika w przypadku zaobserwowania jakichkolwiek zmian w wyglądzie, na przykład obecności wilgoci wewnątrz próbówki.

Ograniczenie użytkowania

Nie stosować po upływie daty ważności podanej na etykiecie produktu.

Nie używać ponownie próbówek.

9. Próbką

Stosować żyłą krew obwodową pobraną do pojemnika na próbki sklasyfikowanego jako wyrób medyczny, z antykoagulantem EDTA, heparyną lub ACD (kwas cytrynowo-dekstrozowy) ⁽¹⁾.

Używać wyłącznie próbki niepoddane obróbce. Nie używać wstępnie lizowanych, przemytych ani rozcieńczonych próbek.

Przetworzyć próbkę krwi w ciągu 48 godzin od pobrania. Przechowywać próbkę w temperaturze laboratoryjnej (20-25°C), jeśli będzie ona przetwarzana w ciągu 24 godzin. Jeśli przetwarzanie jest opóźnione powyżej 24 godzin, ale w ciągu 48 godzin, należy schłodzić próbkę ⁽¹⁾.

Interferencja endogenna

Na podstawie badań literatury naukowej w Tabeli 4 przedstawiono endogenne źródła zakłóceń.

Tabela 4 Endogenna interferencja urządzenia

Interferencja endogenna	Wpływ	Odniesienie
Albumina	Albumina w dużych stężeniach może zakłócać wyniki testu ze względu na swoją zdolność wiązania i uwalniania dużych ilości ligandów.	9, 10, 11
Bilirubina (żółta) (niesprężona)	Bilirubina zwiększa tło fluorescencji komórek ze względu na swoją wysoką autofluorescencję.	12, 13, 14
Pozostałości komórek (po lizie)	Pozostałości komórek mogą powodować niedokładność pomiaru liczby komórek i zmniejszenie ilości przeciwciał w urządzeniu.	15, 16
Erytrocyty	Niewystarczająca liza, obecność czerwonych krwinek w próbce może skutkować błędnym liczeniem komórek.	17
Hemoglobina	Zhemolizowane próbki mogą dawać niewiarygodne wyniki.	18
Ludzkie przeciwciała przeciw mysim	Może to mieć wpływ na funkcjonalność urządzenia (zdolność wiązania się z antygenami na powierzchni komórki).	19
Immunoglobuliny	Może to wpływać na liczbę podgrup limfocytów.	12
Czynniki reumatoidalne	Obecność czynnika reumatoidalnego zakłóca wyniki testów MIA (multipleksowych testów immunoenzymatycznych).	20
Trójglicerydy	Wysokie stężenie lipidów we krwi może mieć wpływ na wyniki analizy metodą cytometrii przepływowej niektórych populacji komórek krwi.	21

Zakłócenia egzogenne

Zgodnie z opublikowanymi pracami Sutherlanda i in. ⁽⁷⁾ czerwone krwinki pochodzące z transfuzji krwi stanowią główne źródło zakłóceń w analizie PNH u pacjentów z dużym klonem PNH doświadczających hemolizy pozanaczyniowej. Zdrowe erytrocyty otrzymane drogą transfuzji mają istotny wpływ na monitorowanie klonu PNH w linii czerwonych krwinek (RBC). Dodanie CD71 znacząco poprawia możliwość analizy rozmiarów klonów PNH w linii RBC, niezależnie od stanu hemolitycznego pacjenta i/lub statusu transfuzji.

Urządzenie DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit rozwiązuje ten problem zgodnie z wcześniej wymienionymi wytycznymi, oferując antygen CD71 do identyfikacji niedojrzałych czerwonych krwinek (iRBC), przy czym iRBC dokonują również ekspresji zakotwiczonego w GPI antygenu CD59. W workach do transfuzji iRBC są zwykle obecne w bardzo małej ilości ⁽²²⁾. Z drugiej strony, u pacjentów doświadczających hemolizy pozanaczyniowej spowodowanej PNH liczba iRBCs jest zwiększona z powodu szybkiej utraty erytrocytów ⁽²³⁾. Dzięki dodaniu monoklonalnego przeciwciała CD71 do identyfikacji iRBC lekarz może dokładniej monitorować postęp PNH, zgłaszany jako utrata antygenu CD59 na iRBC, eliminując interferencję z egzogennymi RBC z worków transfuzyjnych. Zestaw DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit zawiera przeciwciała przeciwko ludzkiemu CD71 i pozwala na wykorzystanie najnowszych wytycznych dotyczących wykrywania i ilościowego oznaczania klonów PNH.

10.Procedura

Przygotowanie dostarczonych odczynników

PNH High-Sensitivity Assay

Nie jest wymagane żadne przygotowanie odczynników dostarczanych w probówkach, wyłącznie do jednorazowego użytku.

Lysing Solution

Przed użyciem należy doprowadzić odczynnik do temperatury pokojowej.

Odczynnik ma 10-krotne stężenie i przed użyciem należy go rozcieńczyć wodą dejonizowaną stosować (1 część stężonego roztworu na 9 części wody dejonizowanej). Po otwarciu odczynnik zachowuje swoje właściwości użytkowe do daty ważności, pod warunkiem przechowywania w podanych warunkach w oryginalnym opakowaniu podstawowym.

Rozcieńczony roztwór lizujący (1X) jest stabilny przez 1 miesiąc, jeśli jest przechowywany w dozowniku lub w zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej.

Przygotowanie wymaganych, a nie zawartych w zestawie materiałów

Cząsteczki kompensacyjne

Przygotować roztwór roboczy cząstek kompensacyjnych cytometrii przepływowej zgodnie z instrukcjami producenta.

Konfiguracja kompensacji

Uzyskaj próbki z zestawem kompensacyjnym przy użyciu tej samej konfiguracji cytometru przepływowego, przed analizą barwionych próbek PNH RBC 3-color i PNH WBC 7-color.

UWAGA: procedury konfiguracji kompensacji PNH RBC 3-color i PNH WBC 7-color różnią się rodzajem przygotowania próbek i barwieniem próbek.

Probówki kompensacyjne PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

1. Dodać zestaw **SPHERO™ COMPtral Kit** lub **równoważne cząsteczki kompensacyjne** na dno każdej jednokolorowej próbki kompensacyjnej.
2. Mieszać i inkubować przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
3. Dodać 4 ml 1X PBS do każdej próbki kompensacyjnej. Wirować przez 5 minut z prędkością 300×g.
4. Odrzucić ciecz sklarowaną nad osadem bez naruszania cząstek kompensacyjnych i dodać 0,1 ml 1X PBS do każdej próbki kompensacyjnej.
5. Ustawić napięcia na detektorach fluorescencji przed analizą wybarwionych próbek. Napięcie na detektorze PMT powinno być ustawione na tyle wysoko, aby jak najmniej zdarzeń wybarwionych ujemnie zakłócało kanał 0 na osi fluorescencji. Również napięcie detektora PMT nie powinno przekraczać wartości, przy których dodatnie zdarzenia są dociskane do prawej osi.
6. Natychmiast pobrać zabarwione próbki kompensacyjne za pomocą cytometru przepływowego.
7. Obliczyć macierz kompensacji PNH RBC 3-color w oprogramowaniu cytometrycznym opracowanym przez producenta lub w oprogramowaniu przeznaczonym do analizy danych z cytometrii offline. Użyć tej macierzy kompensacji dla wszystkich próbek z tej serii PNH RBC 3-color.

UWAGA: po dokonaniu ustawień dla określonej partii PNH RBC 3-color nie należy zmieniać ustawień detektorów fluorescencyjnych, aby zachować te same ustawienia akwizycji macierzy kompensacji i wyniki kompensacji.

Probówki kompensacyjne PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

1. Dodać 50 µl dejonizowanej wody na dno każdej jednokolorowej próbki kompensacyjnej i energicznie wirować przez 7-10 sekund.
2. Dodać **100 µl pełnej krwi obwodowej do każdej jednokolorowej próbki kompensacyjnej** i energicznie wymieszać.
3. Inkubować przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
4. Dodać 2 ml rozcieńczonego (1X) Lysing Solution do każdej próbki kompensacyjnej.
5. Inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.

6. Wirować przez 5 minut z prędkością 300×g, odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem i ponownie zawiesić osad komórek w 2 ml 1X PBS.
7. Wirować przez 5 minut z prędkością 300×g, odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem i ponownie zawiesić osad komórek w 0,2 ml 1X PBS.
8. Ustawić napięcia na detektorach fluorescencji przed analizą wybarwionych próbek. Napięcie na detektorze PMT powinno być ustawione na tyle wysoko, aby jak najmniej zdarzeń wybarwionych ujemnie zakłócało kanał 0 na osi fluorescencji. Również napięcie detektora PMT nie powinno przekraczać wartości, przy których dodatnie zdarzenia są dociskane do prawej osi.
9. Natychmiast pobrać zabarwione próbki kompensacyjne za pomocą cytometru przepływowego.
10. Obliczmacierz kompensacji PNH WBC 7-color w oprogramowaniu cytometru opracowanym przez producenta lub w oprogramowaniu przeznaczonym do analizy danych cytometrii offline. Użyć tej macierzy kompensacji dla wszystkich próbek z tej serii PNH WBC 7-color.

UWAGA: po dokonaniu ustawień dla określonej partii PNH WBC 7-color nie należy zmieniać ustawień detektorów fluorescencyjnych, aby zachować te same ustawienia akwizycji macierzy kompensacji i wyniki kompensacji.

Przygotowanie próbki

Wykrywanie i różnicowanie klonów PNH w erytrocytach przy użyciu próbki PNH RBC 3-color wymaga przygotowania próbki przed procedurą barwienia.

UWAGA: przed obróbką próbki należy upewnić się, że cytometr został prawidłowo ustawiony.

1. Polipropylenową próbkę stożkową oznakować identyfikacją badanej próbki krwi.
2. Odpipetować 10 µl dobrze wymieszanej próbki krwi na dno oznaczonej próbki stożkowej.
3. Rozcieńczyć próbkę krwi 1:100 z 1 ml 1X PBS i mieszać ręcznie, kołyszając przez 5 sekund.

UWAGA: w klasycznej postaci PNH dominuje hemoliza wewnątrznaczyniowa. Przed rozcieńczeniem próbki krwi należy odnieść się do liczby RBC z analizatora hematologicznego w celu uzyskania liczby RBC w rozcieńczonej próbce krwi w zakresie $3 - 5 \times 10^7$ / ml rozcieńczonej krwi i dostosować współczynnik rozcieńczenia zgodnie z wymaganiami w celu uzyskania wystarczającej liczby RBC w cytometrze przepływowym.

4. Natychmiast po rozcieńczeniu próbki przejść do procedury barwienia próbki.

Wykrywanie komórek z niedoborem GPI w neutrofilach i monocytach za pomocą próbówki PNH WBC 7-color nie wymaga przygotowania preparatu przed procedurą barwienia.

Barwienie próbki – próbówka PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

1. Oznaczyć próbówkę PNH RBC 3-color danymi identyfikacyjnymi badanej próbki krwi.
2. **Odpipetować 50 µl dobrze wymieszanej, rozcieńczonej próbki krwi** na dno próbówki PNH RBC 3-color.

UWAGA: unikać pipetowania krwi po ściance próbówki. Jeśli rozmaz lub kropla krwi pozostanie na ściance próbówki, nie zostanie ona zabarwiona odczynnikami, przez co wyniki testu mogą być nieważne.

3. Energicznie wirować przez 7-10 sekund.
UWAGA: skrócenie czasu wirowania może wpłynąć na wyniki testu.
4. Inkubować próbówkę PNH RBC 3-color przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
5. Dodać 4 ml 1X PBS do próbówki PNH RBC 3-color.
6. Wirować próbówkę PNH RBC 3-color przez 5 minut z prędkością 300×g.
7. Odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem bez naruszania osadu komórek i dodać 0,5 ml 1X PBS do próbówki PNH RBC 3-color.
8. Krótco wirować, aby ponownie zawiesić osad komórkowy.

Pobrać wybarwioną próbkę za pomocą cytometru przepływowego. Jeśli zabarwiona próbka nie zostanie pobrana natychmiast, zakręcić próbówkę i przechowywać w ciemności w temperaturze 2-8°C oraz poddać analizie w ciągu 2 godzin.

UWAGA: Rozbij agregaty komórek w zabarwionej próbce, przesuwając próbówkę 6-10 razy po górnej części stojaka na próbówki bezpośrednio przed akwizycją w cytometrze przepływowym. Nadmierna ilość agregatów RBC może wpływać na wyniki testu.

Barwienie preparatu – próbówka PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

1. Oznaczyć próbówkę PNH WBC 7-color danymi identyfikacyjnymi badanej próbki krwi.
2. Dodać **50 µl wody dejonizowanej** do próbówki PNH WBC 7-color. Energicznie wirować przez 7-10 sekund.

UWAGA: skrócenie czasu wirowania może wpłynąć na wyniki testu.

3. Odpipetować **100 µl dobrze wymieszanej próbki krwi** na dno probówki PNH WBC 7-color i energicznie wymieszać.

UWAGA: unikać pipetowania krwi po ścianie probówki. Jeśli rozmaz lub kropla krwi pozostanie na ścianie probówki, nie zostanie ona zabarwiona odczynnikiem, przez co wyniki testu mogą być nieważne.

4. Inkubować przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
5. Dodać 2 ml 1X roboczego roztworu do lizy erytrocytów do probówki PNH WBC 7-color.
6. Inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
7. Wirować probówkę PNH WBC 7-color 5 minut z prędkością 300×g.
8. Odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem bez naruszania osadu komórek i dodać do probówki 2 ml 1X PBS.
9. Wirować probówkę PNH WBC 7-color 5 minut z prędkością 300×g.
10. Odrzucić sklarowany płyn zebrany nad osadem bez naruszania osadu komórek i dodać do probówki 0,2 ml 1X PBS.
11. Krótko wirować, aby ponownie zawiesić osad komórkowy.

Pobrać wybarwioną próbkę za pomocą cytometru przepływowego. Jeśli zabarwiona próbka nie zostanie pobrana natychmiast, zakręcić probówkę i przechowywać w ciemności w temperaturze 2-8°C oraz poddać analizie w ciągu 24 godzin.

Analiza metodą cytometrii przepływowej

Cytometr przepływowy wybrany do użytku z urządzeniem DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit należy rutynowo kalibrować przy użyciu mikrokulek fluorescencyjnych, aby zapewnić stabilną czułość detektorów zgodnie z instrukcjami producenta cytometru.

W przypadku niewłaściwej konserwacji cytometr przepływowy może dawać fałszywe wyniki.

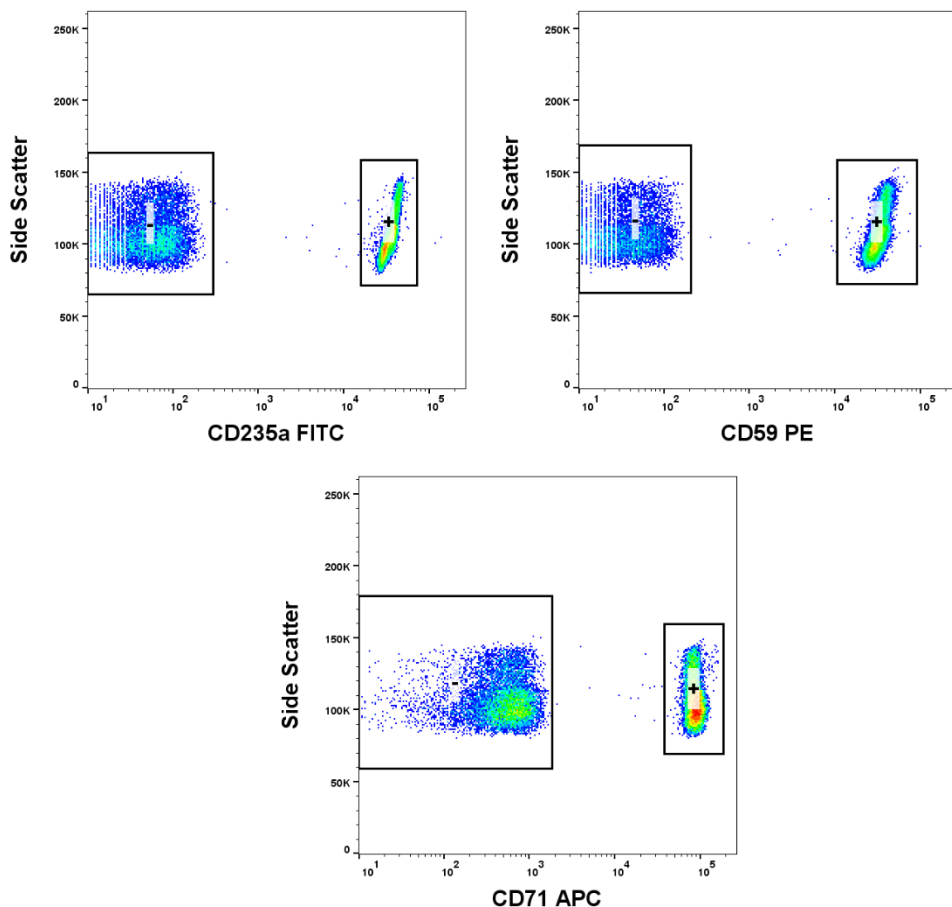
Patrz specyfikacje cytometru producenta dotyczące laserów i detektorów fluorescencyjnych zgodnie z charakterystyką wzbudzenia i emisji fluorochromów w rozdziale 6. Wymagany osprzęt.

Do analizy danych pomiarowych można wykorzystać oprogramowanie cytometryczne opracowane przez producenta lub oprogramowanie dedykowane do analizy danych cytometrycznych offline (np. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analiza probówek kompensacyjnych PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

Wizualizuj dane nieskompensowane dla każdej probówki kompensacyjnej na wykresie punktowym rozproszenia bocznego (SSC) w porównaniu z „fluorochromem do skompensowania”. Ustaw bramki dla dodatnich (+) i ujemnych (-) cząstek kompensacyjnych cytometrii, jak pokazano na rysunku 1.

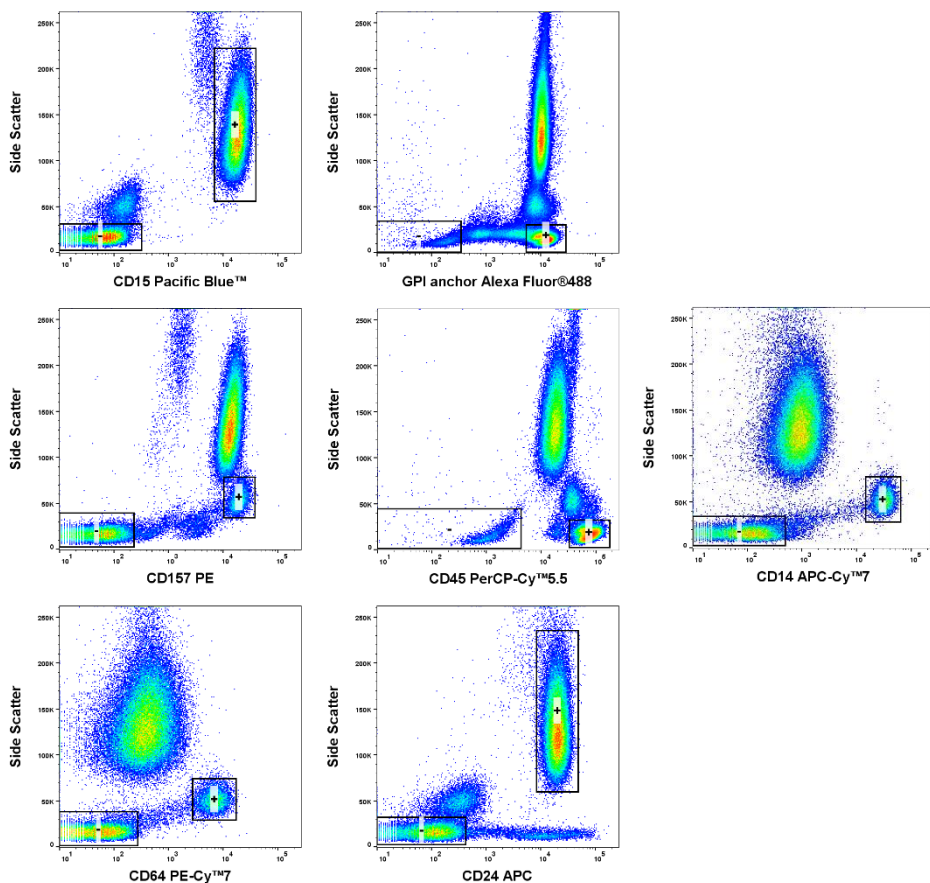
Rysunek 1 Identyfikacja dodatnich (+) i ujemnych (-) cytometrycznych cząstek kompensacyjnych w probówkach kompensacyjnych (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



Analiza probówek kompensacyjnych PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

Wizualizuj dane nieskompensowane dla każdej probówki kompensacyjnej na wykresie punktowym rozproszenia bocznego (SSC) w porównaniu z „fluorochromem do skompensowania”. Ustaw bramki dla najbardziej pozytywnych (+) i najbardziej negatywnych (-) populacji, jak pokazano na rysunku 2.

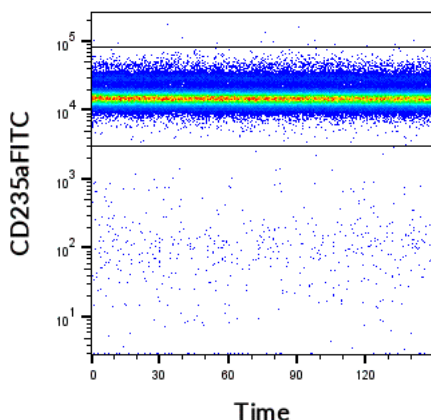
Rysunek 2 Identyfikacja najbardziej pozytywnych (+) i najbardziej negatywnych (-) zdarzeń w probówkach kompensacyjnych (dane zebrane na BD FACSCanto™ II).



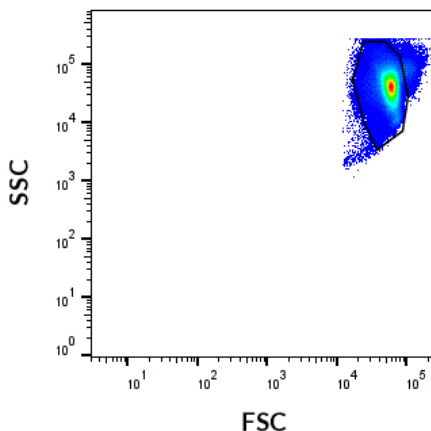
Probówka PNH RBC 3-color (czerwony pasek)

Ze względu na niską liczbę iRBC w rozcieńczonej próbce krwi, do analizy należy pobrać co najmniej 500 000 erytrocytów. Akwizycja $\geq 500\,000$ zdarzeń skutkuje długimi czasami akwizycji. Może to wpływać na równowagę kompleksu wiążącego przeciwciało-antygen i powodować spadek fluorescencji CD235a FITC. Zawsze monitoruj stabilność intensywności fluorescencji w czasie akwizycji (rysunek 3).

Rysunek 3 Sprawdź wszystkie pozyskane zdarzenia na wykresie punktowym, Czas vs. CD235a FITC (dane pozyskane na BD FACSLytic™).

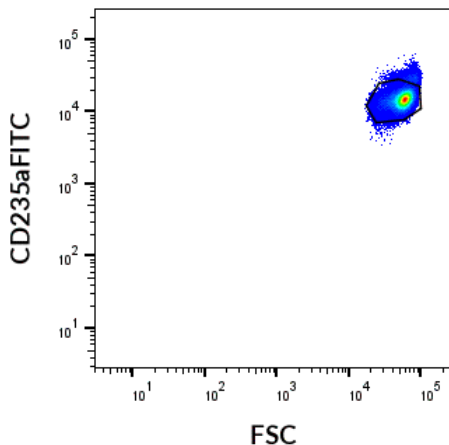


Rysunek 3a Wyświetlenie wszystkich zdarzeń z bramki czasowej na wykresie punktowym FSC-A vs. SSC-A w trybie logarytmicznym (dane pozyskane na urządzeni BD FACSLytic™).



Wizualizacja skompensowanych danych z bramki SSC vs. FSC na wykresie punktowym w trybie logarytmicznym, gdzie oś X reprezentuje FSC, a oś Y intensywność fluorescencji w kanale FITC. Ustaw bramkę „CD235a+ RBC singlets” (rysunek 4).

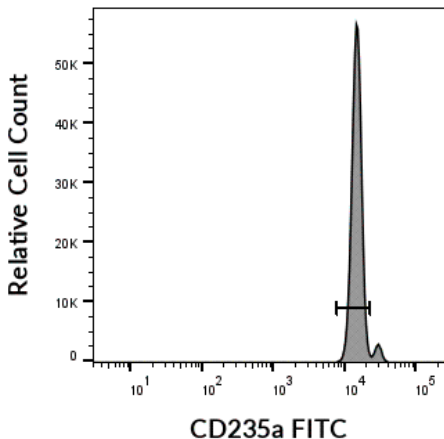
Rysunek 4 Określenie pojedynczych RBC CD235a+ (dane uzyskane na BD FACSLytic™).



Opcjonalnie:

Dla lepszego rozróżnienia singletów możliwa jest wizualizacja skompensowanych danych jako histogramu, gdzie oś X reprezentuje intensywność fluorescencji w kanale FITC. Ustaw bramkę „CD235a+ RBC singlets” (Rysunek 4a).

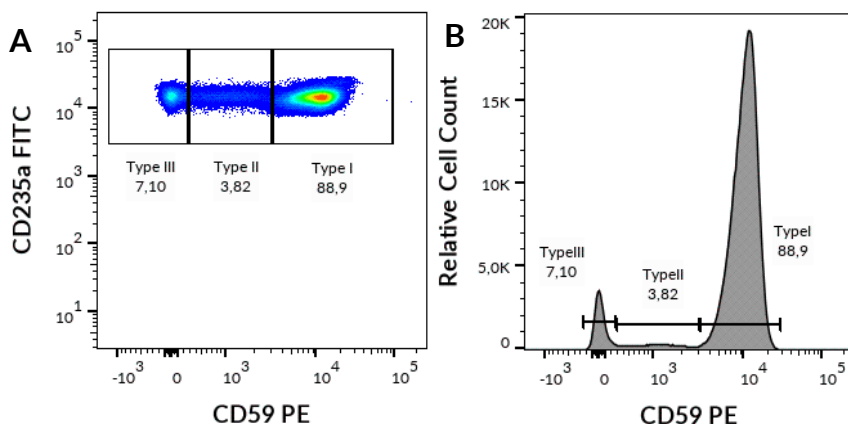
Rysunek 4a Określenie pojedynczych RBC CD235a+ (dane uzyskane na BD FACSLytic™).



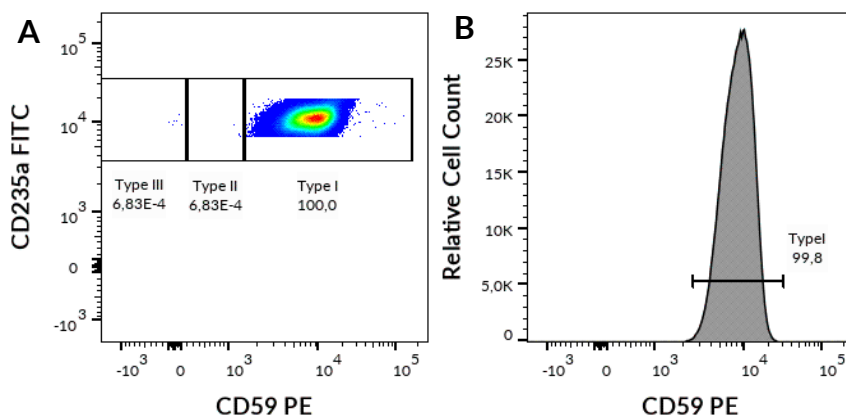
Erytrocyty

Wizualizuj singlety CD235a+ RBC na wykresie punktowym CD59 PE względem CD235a FITC. Rozdzielić zdarzenia na trzy populacje przy użyciu trzech odpowiednich bramek (Rysunek 5a, 5b) i obliczyć procent zdarzeń w regionach typu I, typu II i typu III. W celu lepszego dostosowania regionów między typem II i III w niektórych sytuacjach przydatny może być histogram.

Rysunek 5a Pacjent z klonem PNH: A) CD235a+ RBC singlets w dot-plot CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD235a+ RBC singlets w CD59 PE vs. histogram (dane uzyskane na BD FACSLyric™).



Rysunek 5b Zdrowy dawca: A) CD235a+ RBC singlets w dot-plot CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD235a+ RBC singlets w CD59 PE vs. histogram (dane uzyskane na BD FACSLyric™).

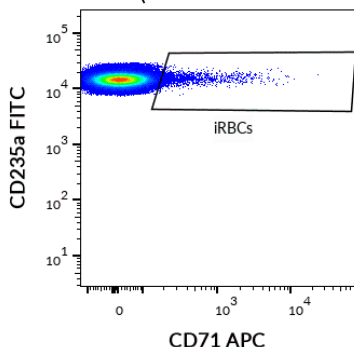


iRBCs (niedojrzałe retikulocyty)

U pacjentów otrzymujących transfuzje krwi określenie rzeczywistego odsetka RBC typu II i III PNH może być trudne. Zdrowe RBC od dawcy krwi krążące w krwiobieg pacjenta z PNH wpływają na dokładność oznaczenia odsetka klonu PNH. Dodanie CD71 może być pomocne w celu wykluczenia przetoczonych komórek dawcy ⁽⁶⁾.

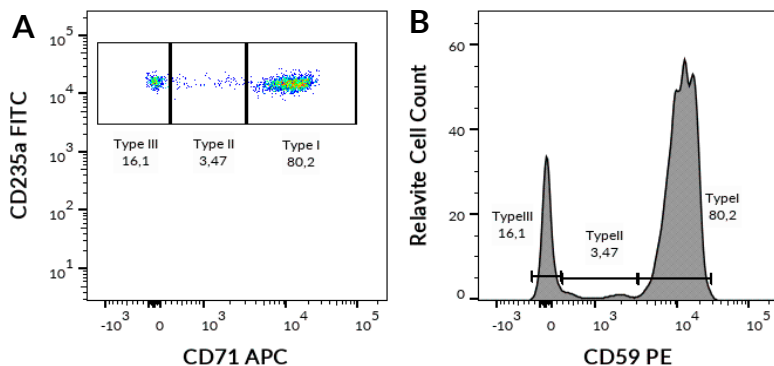
Wizualizacja CD235a+ RBC singlets w dot-plot CD71 APC versus CD235a FITC i oddzielenie CD71+ iRBC (rysunek 6).

Rysunek 6 Singlety CD235a+ RBC na wykresie punktowym CD71 APC vs. CD235a FITC. Wyznaczanie iRBCs CD71+ (dane zebrane na BD FACSLytic™).



Wizualizacja CD71+ iRBC na wykresie punktowym CD59 PE versus CD235a FITC oraz na wykresie CD59 PE vs. histogram (rysunek 7). Rozdzielić zdarzenia na trzy populacje przy użyciu trzech odpowiednich bramek i obliczyć procent zdarzeń w regionach typu I, typu II i typu III.

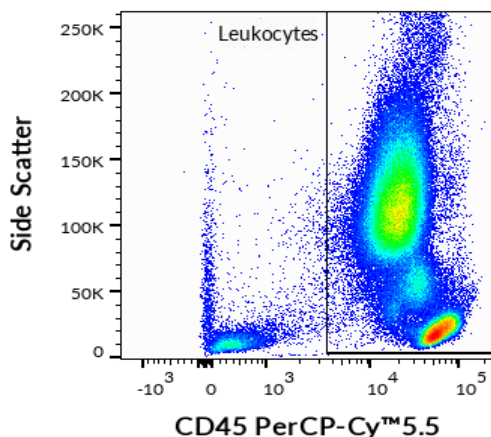
Rysunek 7 Pacjent z klonem PNH, ale bez transfuzji: A) CD71+ iRBC na wykresie punktowym CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD71+ iRBC na wykresie CD59 PE vs. histogram (dane pozyskane na BD FACSLytic™).



Probówka PNH WBC 7-color (pasek cyjan)

Pozyskać co najmniej 50 000 neutrofili i 10 000 monocytów, co oznacza co najmniej 200 000 zdarzeń do analizy. Wizualizuj skompensowane dane na wykresie punktowym rozproszenia bocznego względem intensywności fluorescencji w PerCP-Cy™ 5.5. Ustaw bramkę leukocytów CD45+, jak pokazano na rysunku 8.

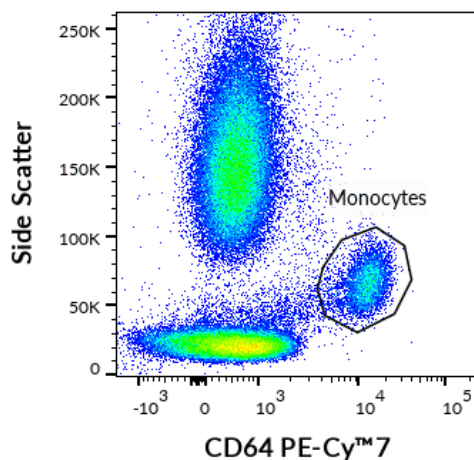
Rysunek 8 Wyznaczanie leukocytów CD45+ (dane zebrane na BD FACSLytic™).



Monocyty

Wizualizuj leukocyty CD45+ na rozproszonym-wykresie bocznym-względem CD64 PE-Cy™7 i rozgranicz monocyty CD64+, jak pokazano na rysunku 9.

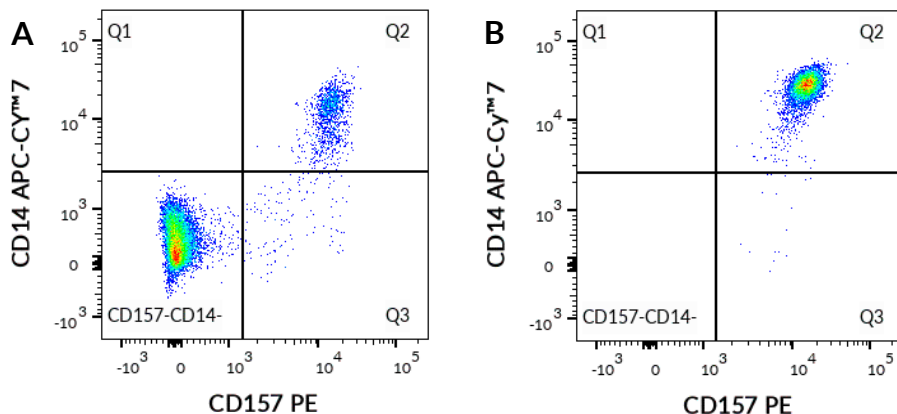
Rysunek 9 Wyodrębnienie monocytów CD64+ z leukocytów (dane zebrane na BD FACSLytic™).



Wizualizuj monocyty CD64+ na wykresie punktowym CD157 PE względem CD14 APC-Cy™7 (rysunek 10). Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji CD157-CD14-.

Rysunek 10 Monocyty CD64+ na wykresie punktowym CD157 PE vs. CD14 APC-Cy™7 (dane zebrane na BD FACSLytic™).

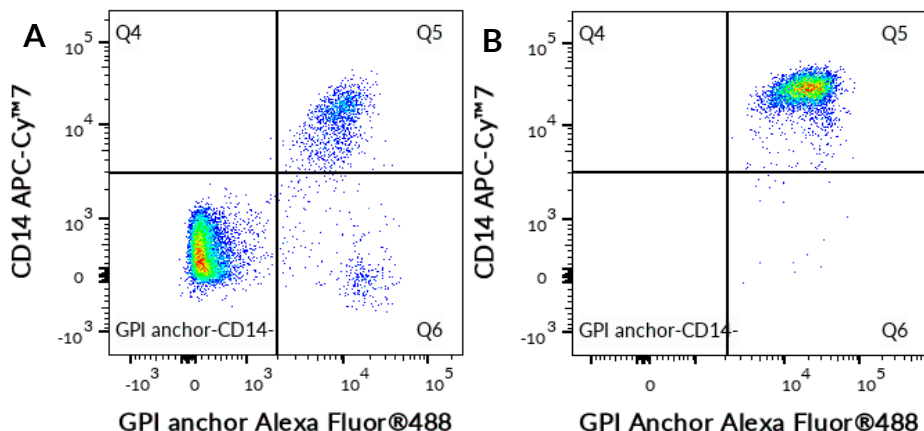
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same monocyty CD64+ na wykresie - punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 (proaerolizyna) w porównaniu z CD14 APC-Cy™7 (rysunek 11). Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji kotwicy GPI-CD14-.

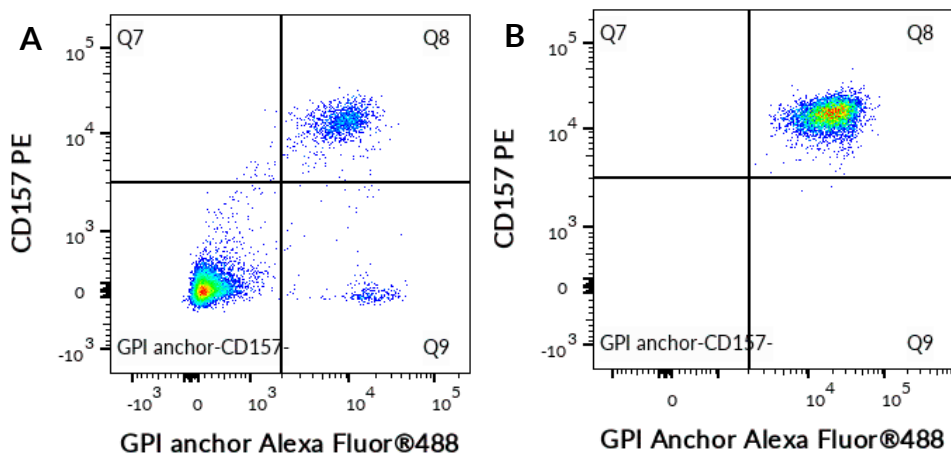
Rysunek 11 Monocyty CD64+ na wykresie punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 vs. CD14 APC-Cy™7 (dane zebrane na BD FACSLytic™).

A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same monocyty CD64+ na wykresie-punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 (proaerolizyna) w porównaniu z CD157 PE (rysunek 12). Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji kotwicy GPI- CD157-.

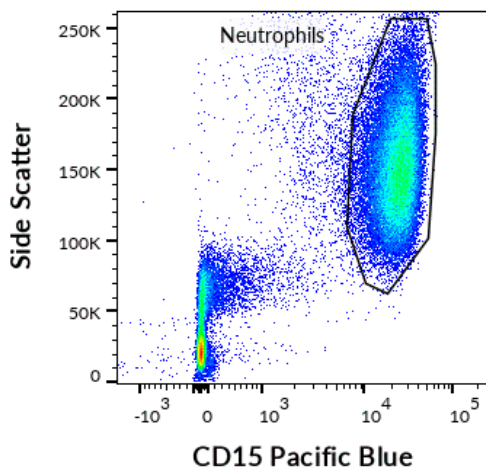
Rysunek 12 Monocyty CD64+ na wykresie punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 vs. CD157 PE (dane zebrane na BD FACSLyric™). A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Neutrofile

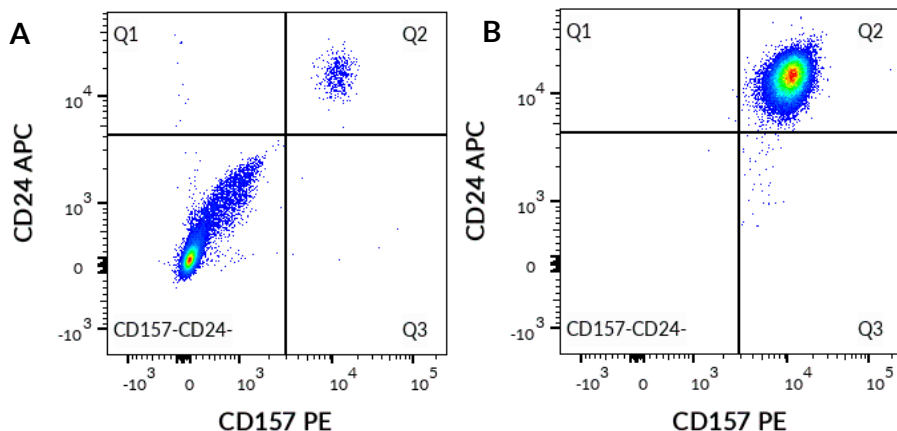
Wizualizuj leukocyty CD45+ na rozproszonym wykresie-punktowym bocznym-w porównaniu z CD15 Pacific Blue™ i oddziel neutrofile CD15+, jak pokazano na rysunku 13.

Rysunek 13 Wyróżnienie neutrofilii CD15+ z leukocytów (dane zebrane na BD FACSLyric™).



Zwizualizuj neutrofile CD15+ na wykresie-punktowym CD157 PE w porównaniu z CD24 APC, jak pokazano na rysunku 14. Ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji CD157-CD24-.

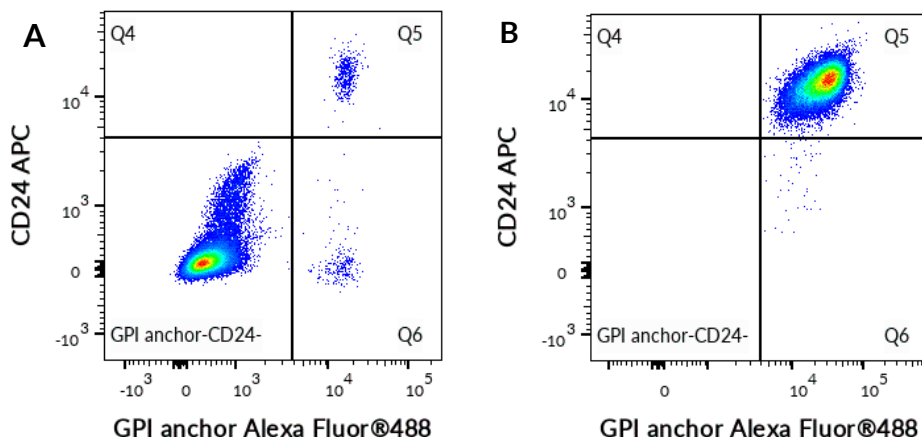
Rysunek 14 Neutrofile CD15+ na wykresie-punktowym CD157 PE vs. CD24 APC (dane zebrane na BD FACSLyric™). A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same neutrofile CD15+ na wykresie-punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 (proaerolizyna) względem CD24 APC, ustaw odpowiednie bramki i oblicz procent populacji kotwicy GPI- CD24-, jak pokazano na rysunku 15.

Rysunek 15 Neutrofile CD15+ na wykresie-punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 w porównaniu z CD24 APC (dane zebrane na BD FACSLyric™).

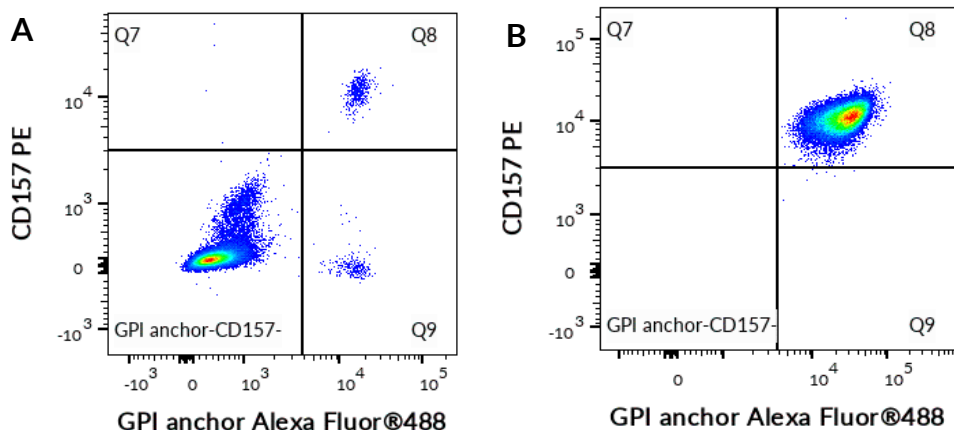
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Następnie zwizualizuj te same neutrofile CD15+ na wykresie- punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 (proaerolizyna) względem CD157 PE, ustaw odpowiednie bramki i oblicz odsetek populacji kotwicy GPI- CD157-, jak pokazano na rysunku 16.

Rysunek 16 Neutrofile CD15+ w na wykresie-punktowym kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 w porównaniu z CD157 PE (dane zebrane na BD FACSLytic™).

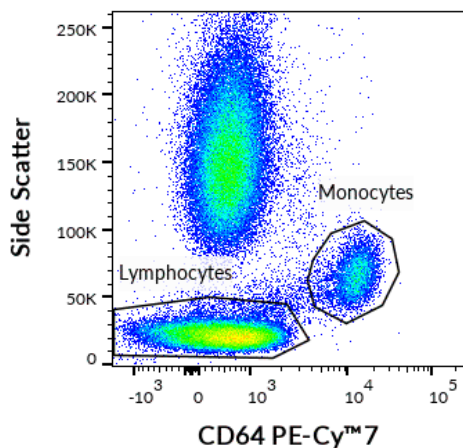
A) pacjent z klonem PNH; B) zdrowy dawca



Kontrola wewnętrzna

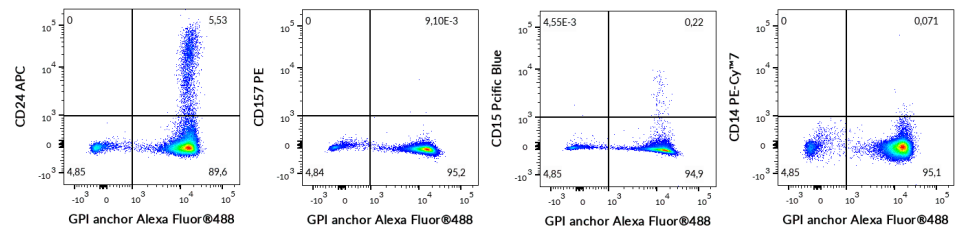
Aby zweryfikować napięcie detektora fluorescencji i kompensację, konieczne jest sprawdzenie kontroli wewnętrznej (rysunek 18). Na wykresie CD64 PE-Cy™7 versus side scatter należy wybrać limfocyty jako populację kontroli wewnętrznej (Rysunek 17).

Rysunek 17 Odróżnienie limfocytów CD64 od leukocytów (dane uzyskane w BD FACSLytic™).



Następnie wizualizacja limfocytów na wykresach punktowych kotwicy GPI Alexa Fluor® 488 (proaerolizyna) kontra CD24 APC/CD157 PE/CD15 Pacific Blue™/CD14 PE-Cy™7 w celu weryfikacji ustawień napięcia, kompensacji i działania przeciwciał (rysunek 18).

Rysunek 18 Kontrole wewnętrzne (dane uzyskane na BD FACSLyric™).



Obliczanie i interpretacja wyników analiz

Wylicz odsetek komórek z niedoborem GPI (mających fenotyp PNH), patrz tabela 5.

Tabela 5 Fenotypy klonów PNH

Populacja komórek macierzystych		Fenotyp PNH zgodnie ze strategią bramkowania
Probówka PNH RBC 3-color	Erytrocyty (Typ III)	CD59- CD235a+ (rys. 5)
	Erytrocyty (Typ II)	CD59 przyciemniony CD235a+ (rys. 5)
	iRBCs (Typ III)	CD59- CD235a+CD71+ (rys. 7)
	iRBCs (typ II)	CD59 przyciemniony CD235a+CD71+ (rys. 7)
Probówka PNH WBC 7-color	Monocyty	CD14- CD157- CD64+ (rys. 10)
		CD14- kotwica GPI - CD64+ (rys. 11)
		CD157- kotwica GPI - CD64+ (rys. 12)
	Neutrofile	CD24- CD157- CD15+ (rys. 14)
		CD24- kotwica GPI - CD15+ (rys. 15)
		CD157- kotwica GPI - CD15+ (rys. 16)

Tabela 6 Interpretacja wyników

Granica wykrywalności (LOD) dla próbek WBC i RBC podana jako częstość rodzicielska (%), obliczona na podstawie 100 pomiarów n=25 próbek zdrowych pacjentów na n=4 różnych platformach cytometrycznych				
Fenotyp PNH	Cytometr			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
Probówka PNH RBC 3-color				
CD59- Typ II i Typ III RBC	0,005	0,002	0,029	0,049
CD59- iRBCs typu II i typu III	0,240	0,320	0,388	0,562
Probówka PNH WBC 7-color				
CD157- CD14- Monocyty	0,20	0,19	0,14	0,30
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	0,08	0,04	0,10	0,17
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	0,07	0,06	0,04	0,03
CD157- CD24- Neutrofile	0,02	0,02	0,06	0,03
Kotwica GPI- CD24- Neutrofile	0,03	0,03	0,02	0,02
Kotwica GPI- CD157- Neutrofile	0,01	0,01	0,01	0,01

Zasady algorytmu raportowania niedoboru GPI ⁽⁶⁾:

1. Zgłaszanie klonu PNH w próbówce RBC

Populacja komórek	Częstotliwość	Wynikające stwierdzenie i działanie ⁽⁶⁾
CD59- RBC typu II + typu III	< LOD	„Nie wykryto komórek PNH” Rzadkie komórki o fenotypie PNH zarejestrowane poniżej poziomu wykrywalności
	> 1%	„Obecny klon PNH” Można zgłaszać odsetek komórek
	> LOD (tabela 6) < 0,01 % ⁽⁶⁾	„Obecność komórek PNH” Rzadkie komórki o fenotypie PNH zarejestrowane poniżej poziomu kwantyfikacji

2. Zgłoszenie klonu PNH w próbówce WBC

Populacja komórek	Częstotliwość (%)	Wynikające z tego stwierdzenie i działanie ⁽⁶⁾
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	< LOD	„Nie wykryto komórek PNH” Rzadkie komórki o fenotypie PNH zarejestrowane poniżej poziomu wykrywalności
	> 1%	„Obecny klon PNH” Można zgłaszać odsetek komórek
	> LOD (Tabela 6); <LLOQ (tabele 13 i 14)	„Obecność komórek PNH” Można zgłaszać odsetek komórek
Kotwica GPI - CD24 - neutrofile	< LOD	„Nie wykryto komórek PNH” Rzadkie komórki o fenotypie PNH zarejestrowane poniżej poziomu wykrywalności
	> 1%	„Obecny klon PNH” Można zgłaszać odsetek komórek
	> LOD (Tabela 6); <LLOQ (tabele 13 i 14)	„Obecność komórek PNH” Można zgłaszać odsetek komórek

3. Zgłosić wielkość klonu PNH w RBC.

Należy podać całkowitą wielkość klonu PNH, a także wartości procentowe dla populacji PNH typu II i typu III, wraz z liczbą populacji komórek uzyskaną zgodnie z tabelą 7.

4. Podać wielkość klonu PNH w WBC.

Należy podać wielkość klonu PNH w obu liniach – neutrofilach i monocytach. Klony PNH w WBC wydają się skupione i mniej rozproszone niż przypadkowe zdarzenia podwójnie ujemne. Monocyty mogą wykazywać większe rozmiary

klonów PNH niż neutrofile ⁽²⁾. Niedobór GPI (obecność klonu PNH) powinien być wyrażony we wszystkich fenotypach PNH w danym podzbiórze leukocytów. Oczekuje się, że wszystkie fenotypy monocytów z PNH (tabela 5) będą barwić komórki z niedoborem GPI w podobny sposób ⁽⁶⁾. To samo dotyczy fenotypów PNH neutrofili.

Terminologia zgłaszania klonu PNH (zgodnie z CLSI H52-A2):

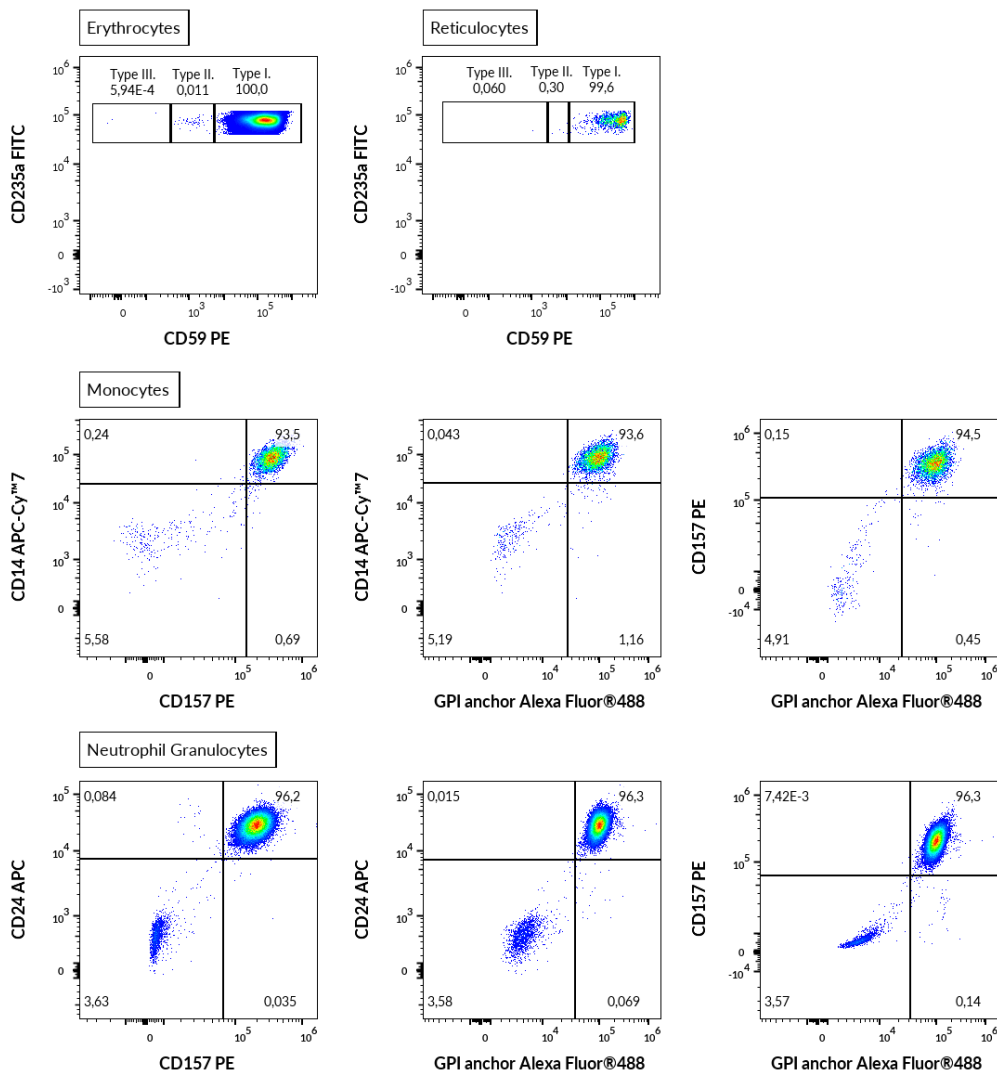
- a. Populacja PNH >1%: „klon PNH”
- b. Populacja PNH od 0,1% do 1%: „pomniejszy klon PNH”
- c. Populacja PNH <0,1%: „rzadkie komórki z fenotypem PNH”

Tabela 7 Przykłady możliwych wyników badania (nie od pojedynczego pacjenta) dla cytometru przepływowego BD FACLyric™.

Fenotyp PNH	Liczba zdarzeń PNH	Liczba zdarzeń w populacji rodzielskiej	Częstotliwość	LLOQ	Ocena
CD59- CD235a+ RBC	3 zdarzenia	521 023 pojedynczych RBC	0,0006%	0,01% ⁽⁶⁾	„Nie wykryto komórek PNH” Rzadkie komórki o fenotypie PNH zarejestrowane poniżej poziomu wykrywalności
CD24- Kotwica GPI- CD15+	69 851 zdarzeń	75 849 neutrofili	92,1%	0,088% (tabela 13)	„Wykryto klon PNH” 92,1% wielkość klonu PNH neutrofili
CD14- Kotwica GPI- CD64+	13 zdarzeń	12 497 monocytów	0,103%	0,141% (tabela 13)	„Obecność komórek PNH; Niewielki klon PNH” 0,103% wielkość klonu PNH monocytów

5. Do raportu można opcjonalnie dołączyć **histogramy i wykresy punktowe**.

Rysunek 19 Przykład przypadku z obecnością klonu PNH w próbce WBC, podczas gdy nie został on wykryty w próbce RBC (dane zebrane na urządzeniu Beckman Coulter DxFLEx).



11. Wydajność analityczna

Specyficzność

Proaerolysin Alexa Fluor® 488 to znakowana fluorescencyjnie odmiana aerolizyny bakteryjnej, która specyficznie wiąże się z kotwicami GPI powierzchniowych białek błonowych w komórkach ludzkich ^(1, 2, 5, 8).

Przeciwciało SY11B5 rozpoznaje zewnątrzkomórkowy epitop na antygenie CD157 białka CD157 wyrażanego głównie na monocytach i granulocytach. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA X).

Przeciwciało 2D1 rozpoznaje wszystkie izoformy leukocytów ludzkich CD45 (wspólny antygen leukocytów). Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez Radę HCDM (warsztaty HLDA III).

Przeciwciało 10.1 rozpoznaje ludzki antygen CD64, który ulega ekspresji na monocytach. Specyficzność przeciwciała została potwierdzona przez warsztaty HLDA (warsztaty HLDA III: WS Code M-250).

Przeciwciało SN3 reaguje z antygenem CD24, ekspresjonowanym przez granulocyty. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztat HLDA (HLDA IV: WS Code B 136; HLDA V: WS Code B CD24.7)

Przeciwciało MEM-15 reaguje z CD14, glikoproteiną błony zewnątrzkomórkowej połączoną z GPI (glikozylofosfatydilinozytolem), ulegającą ekspresji na monocytach. Specyficzność przeciwciała została potwierdzona przez radę HCDM (warsztaty 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).

Przeciwciało MEM-158 reaguje z CD15, silnie ekspresjonowanym na powierzchni granulocytów. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez radę HCDM (warsztaty HLDA VI: WS Code AS A053).

Przeciwciało JC159 rozpoznaje epitop zewnątrzkomórkowej części CD235a (glikoforyna A), sialoglikoproteinę ekspresjonowaną na wczesnych erytroblastach, późnych erytroblastach, erytroblastach i dojrzałych erytrocytach.

Przeciwciało MEM-43 reaguje z dobrze zdefiniowanym epitopem na glikoproteinie zakotwiczonej w CD59 (Protectin), (GPI), ekspresjonowanej na powierzchni wszystkich komórek krwiotwórczych. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztat HLDA (warsztat 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).

Przeciwciało MEM-75 reaguje z zewnątrzkomórkowym epitopem antygeny CD71 ekspresjonowanego na niedojrzałych iRBCs. Swoistość przeciwciała została potwierdzona przez warsztat HLDA (warsztat HLDA IV: WS Code A 45; HLDA V: WS Code T T-165).

Dokładność

Dokładność metody została oceniona poprzez porównanie urządzenia DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit z metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego (koktajl jednokolorowych sprzężonych przeciwciał od różnych producentów i analizowany przy użyciu BD FACSCanto™ II) poprzez równoległe barwienie 13 pacjentów z potwierdzoną obecnością fenotypu PNH. Parametry analizy regresji liniowej przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8 Analiza regresji liniowej dla względnej liczby populacji komórek z niedoborem GPI u pacjentów z potwierdzoną obecnością fenotypów PNH. Porównanie zestawu DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay analizowanego przy użyciu BD FACSCanto™ II z wewnętrzną metodą akredytowanego laboratorium klinicznego.

Fenotyp PNH	n	Nachylenie	Przechwyt	R ²	Zakres [%]
CD59-CD235a+ erytrocyty typu III	13	0,99	-0,026	1,00	1,28 – 83,79
CD59-CD235a+ iRBCs typu III	13	0,99	-0,384	1,00	5,97 – 97,78
CD59-CD235a+ erytrocyty typu II	13	1,00	-0,059	1,00	0,13 – 89,92
CD59-CD235a+ iRBCs typu II	13	0,98	0,141	1,00	0,33 – 74,67
CD157- kotwica GPI-monocyty CD64+	13	1,00	0,060	1,00	2,07 – 99,95
CD157- kotwica GPI-neutrofile CD15+	13	0,99	0,294	1,00	0,80 – 99,82
Kotwica CD14- GPI-monocyty CD64+	13	Nieokreślono			2,04 – 99,96
Monocyty CD14- CD157-CD64+	13	Nieokreślono			2,17 – 99,96
CD24- CD157- CD15+ neutrofile	13	Nieokreślono			0,80 – 99,83
CD24- kotwica GPI-neutrofile CD15+	13	Nieokreślono			0,81 – 99,80

n = liczba próbek krwi

Granica wykrywalności

Granica wykrywalności (LOD) została określona dla każdej populacji docelowej (patrz tabela 5) jako średnia wartość wyników uzyskanych od 25 zdrowych dawców krwi, powiększona o trzy odchylenia standardowe od średniej dla 4 różnych platform cytometrów przepływowych (tabele 9, 10, 11 i 12).

Tabela 9 Wartości LOD zestawu DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit dla każdego fenotypu PNH uzyskane na cytometrze przepływowym BD FACSLytic™.

Fenotyp PNH	BD FACSLytic™				
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	LOD (Średnia + 3*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% zdarzeń pojedynczych RBC)*					
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,003	0,001	5 – 48 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń	0,005 %
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,054	0,061	0–5 zdarzeń na 3000 iRBCs	0,240 %
Probówka WBC (uzyskano 50 000 neutrofilii i 10 000 monocytów)					
CD157- CD14-Monocyty	25	0,076	0,041	2–24 zdarzenia na 10 000 monocytów	0,20 %
Kotwica GPI- CD14-Monocyty	25	0,021	0,018	0–5 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,08 %
Kotwica GPI- CD157-Monocyty	25	0,014	0,020	0–4 zdarzenia na 10 000 monocytów	0,07 %
CD157- CD24-Neutrofile	25	0,006	0,006	0–10 zdarzeń na 50 000 neutrofilii	0,02%
Kotwica GPI- CD24-Neutrofile	25	0,006	0,008	0–15 zdarzeń na 50 000 neutrofilii	0,03 %
Kotwica GPI- CD157-Neutrofile	25	0,002	0,002	0–4 zdarzeń na 50 000 neutrofilii	0,01 %

UWAGA*: Do analizy w płynnym koktajlu przeciwciał zaleca się co najmniej 98% zdarzeń singletowych ⁽²⁴⁾. Wysuszony koktajl przeciwciał w teście DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay zwykle pozwala na niższą częstotliwość zdarzeń singletowych, a częstotliwość 98% singletów może nie zostać osiągnięta.

Tabela 10 Wartości LOD zestawu DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit dla każdego fenotypu PNH uzyskane na cytometrze przepływowym BD FACSCanto™ II.

Fenotyp PNH	BD FACSCanto™ II				
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	LOD (Średnia + 3*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% pojedynczych zdarzeń RBC)					
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,0006	0,0004	1 – 12 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń	0,002 %
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,0657	0,0847	0 – 5 zdarzeń na 1000 iRBCs	0,320%
Probówka WBC (uzyskano 50 000 neutrofili i 10 000 monocytów)					
CD157- CD14- Monocyty	25	0,085	0,035	2–16 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,19%
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	25	0,086	0,096	0–3 zdarzenia na 10 000 monocytów	0,04%
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	25	0,084	0,019	0–7 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,06 %
CD157- CD24- Neutrofile	25	0,004	0,052	0–8 zdarzeń na 50 000 neutrofili	0,02%
Kotwica GPI- CD24- Neutrofile	25	0,006	0,010	0–16 zdarzenia na 50 000 neutrofili	0,03 %
Kotwica GPI- CD157- Neutrofile	25	0,002	0,002	0–4 zdarzeń na 50 000 neutrofili	0,01 %

Tabela 11 Wartości LOD DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit dla każdego fenotypu PNH uzyskane na cytometrze przepływowym Beckman Coulter Navios EX.

Fenotyp PNH	Beckman Coulter NAVIOS EX				
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	LOD (Średnia + 3*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% pojedynczych zdarzeń RBC)					
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,007	0,007	4–236 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń	0,029%
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,087	0,100	0–6 zdarzeń na 1000 iRBCs	0,388%
Probówka WBC (uzyskano 50 000 neutrofili i 10 000 monocytów)					
CD157- CD14-Monocyty	25	0,062	0,027	0–23 zdarzenia na 10 000 monocytów	0,14%
Kotwica GPI- CD14-Monocyty	25	0,024	0,006	0–10 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,10%
Kotwica GPI- CD157-Monocyty	25	0,007	0,011	0–6 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,04%
CD157- CD24-Neutrofile	25	0,012	0,015	0–21 zdarzenia na 50 000 neutrofili	0,06 %
Kotwica GPI- CD24-Neutrofile	25	0,005	0,005	0–6 zdarzeń na 50 000 neutrofili	0,02%
Kotwica GPI- CD157-Neutrofile	25	0,002	0,002	0–5 zdarzeń na 50 000 neutrofili	0,01 %

Tabela 12 Wartości LOD zestawu DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit dla każdego fenotypu PNH uzyskane na cytometrze przepływowym Beckman Coulter DxFLEx.

Fenotyp PNH	Beckman Coulter DxFLEx				
	n	Średnia [%]	SD [%]	Częstość występowania fenotypu PNH	LOD (Średnia + 3*SD)
Probówka RBC (1 000 000 uzyskanych zdarzeń; min. 80% pojedynczych zdarzeń RBC)					
CD59- Typ II i Typ III RBC	25	0,015	0,012	5 – 48 zdarzeń na 1 000 000 zdarzeń	0,049%
CD59- iRBCs typu II i typu III	25	0,106	0,152	0 – 5 zdarzeń na 1000 iRBCs	0,562%
Probówka WBC (uzyskano 50 000 neutrofili i 10 000 monocytów)					
CD157- CD14- Monocyty	25	0,092	0,068	0–27 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,30%
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	25	0,053	0,040	0–16 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,17%
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	25	0,005	0,009	0–1 zdarzeń na 10 000 monocytów	0,03 %
CD157- CD24- Neutrofile	25	0,010	0,008	0–14 zdarzeń na 50 000 neutrofili	0,03 %
Kotwica GPI- CD24- Neutrofile	25	0,008	0,006	0–10 zdarzeń na 50 000 neutrofili	0,02%
Kotwica GPI- CD157- Neutrofile	25	0,002	0,002	0–3 zdarzeń na 50 000 neutrofili	0,01 %

Granica oznaczalności

Dolna granica oznaczalności (LLOQ) została określona przez seryjne rozcieńczenia (1:10, 1:100, 1:1000 i 1:10000) świeżej próbki PNH ze świeżą próbką normalnej krwi i oceniona przez potrójne barwienie i analizę przy użyciu cytometrów przepływowych BD FACSLyric™ i Beckman Coulter DxFlex. Jako kryterium czułości dla LLOQ wybrano maksymalny współczynnik zmienności wynoszący 10%.

Tabela 13 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit – wartości częstotliwości LLOQ uzyskane na cytometrze przepływowym BD FACSLyric™.

Fenotyp PNH	Rozcieńczenie	Liczba komórek PNH	LLOQ	CV
CD59- typ II i typ III RBC	1:10 000	101	0,029 %	3,9 %
CD157- CD14- Monocyty	1:10 000	28	0,677 %	2,3 %
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	1:10 000	7	0,130 %	7,7 %
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	1:10 000	2	0,018 %	9,9 %
CD157- CD24- Neutrofile	1:10 000	3	0,012 %	3,6 %
Kotwica GPI- CD24- Neutrofile	1:10 000	1	0,009 %	8,7 %
Kotwica GPI- CD157- Neutrofile	1:10 000	1	0,010 %	1,2 %

Tabela 14 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit – wartości częstotliwości LLOQ uzyskane na cytometrze przepływowym Beckman Coulter DxFLEX.

Fenotyp PNH	Rozcieńczenie	Liczba komórek PNH	LLOQ	CV
CD59- typ II i typ III RBC	1:10 000	101	0,005 %	9,1 %
CD157- CD14- Monocyty	1:10 000	22	0,143 %	4,0 %
Kotwica GPI- CD14- Monocyty	1:10 000	4	0,026 %	2,2 %
Kotwica GPI- CD157- Monocyty	1:10 000	11	0,068 %	5,9 %
CD157- CD24- Neutrofile	1:10 000	29	0,024 %	4,2 %
Kotwica GPI- CD24- Neutrofile	1:10 000	8	0,007 %	7,1 %
Kotwica GPI- CD157- Neutrofile	1:10 000	9	0,007 %	8,5 %

UWAGA: Do analizy metodą cytometrii przepływowej wykorzystano następujące cytometry przepływowe wraz z wersją oprogramowania:
 BD FACSCanto™ II BD FACSDiva Software – wersja 8.0.2
 BD FACSLytic™ BD FACSuite™ Software – wersja v1.5.0.925
 Beckman Coulter DxFLEx CytExpert for DxFLEx – wersja 2.0.2.18
 Beckman Coulter Navios EX Navios EX Software – wersja 2.2

Do oceny zmierzonych danych wykorzystano platformę analityczną: FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - wersja 10.9.0

12.Wydajność kliniczna

Pacjenci z niedoborem GPI

Dane kliniczne zebrano w ośrodku klinicznym od 19 pacjentów, zarówno zdrowych ⁽⁶⁾, jak i z potwierdzonym niedoborem GPI ⁽¹³⁾. Określono skuteczność kliniczną jako porównanie urządzenia DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit z metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego (koktajl skoniugowanych jednokolorowych przeciwciał pochodzących od różnych producentów i analizowanych przy użyciu BD FACSCanto™ II).

Niedobór GPI u pacjentów oceniano w odniesieniu do zastosowanej metody (tabela 15) poprzez wykrywanie komórek z niedoborem GPI (klony PNH).

Tabela 15 Wydajność kliniczna urządzenia DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Ocena niedoborów GPI metodą wewnętrzną akredytowanego laboratorium klinicznego	
		Niedobór GPI	Normalny stan
Ocena niedoborów GPI za pomocą urządzenia DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Niedobór GPI	13 pacjentów	0 pacjentów
	Normalny stan	0 pacjentów	6 pacjentów

13. Oczekiwane wartości

Interwał odniesienia

W populacji normalnej nie wykryto niedoboru GPI, a wszystkie wartości procentowe fenotypu PNH powinny być niższe od wartości Assay Cut-off (LOD) ⁽⁶⁾.

14. Ograniczenia

Nie zidentyfikowano ograniczeń stosowania w określonych typach chorób, takich jak niedokrwistość.

Zgłaszanie braków GPI jest ograniczone zgodnie z aktualnymi opublikowanymi wytycznymi ⁽⁶⁾.

Klon PNH nie jest wykrywany w limfocytach, ponieważ występuje częściej w neutrofilach i monocytach niż w dojrzałych limfocytach, co sugeruje, że komórki limfoidalne są długowieczne i mogą istnieć przed utworzeniem lub ekspansją klonów PNH.

15. Bibliografia

- 1) Borowitz, MJ et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):211-30. doi: 10.1002/cyto.b.20525.
- 2) Sutherland, DR et al. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2012; 82B: 195–208.
- 3) Marinov, I. et al. Performance Characteristics of a Non-Fluorescent Aerolysin-Based Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) Assay for Simultaneous Evaluation of PNH Neutrophils and PNH Monocytes by Flow Cytometry, Following Published PNH Guidelines. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Mar;94(2):257-263. doi: 10.1002/cyto.b.21389.
- 4) Dezern, AE et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders, part 1 – clinical utility. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 16– 22.
- 5) Sutherland, DR et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders, part 2 – reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 23–48.
- 6) Illingworth, A et al. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 49– 66.

- 7) Sutherland DR, et al. CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal immature RBCs in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Mar;98(2):179-192. doi: 10.1002/cyto.b.21853.
- 8) Sutherland, DR et al. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jul;94(4):637-651. doi: 10.1002/cyto.b.21626.
- 9) Tate, J. et al. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
- 10) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603.
- 11) Frengen, J. et al. Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, *Clinical Chemistry*, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>
- 12) Htun, NM et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x
- 13) Haga Y, et al. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem.* 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d.
- 14) XUE Yan, et al. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2022, 37(12): 1169-1173
- 15) Higgins J, et al. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07.
- 16) Lam, Wing Kit et al. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *International journal of laboratory hematology* vol. 44,6 (2022): 983-985. doi:10.1111/ijlh.13859.
- 17) Hervé Lecoœur, et al. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes, *Journal of Immunological Methods*, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 18) de Jonge G, et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J*

- Clin Lab Anal. 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396.
- 19) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin Chem. 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: Clin Chem 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
 - 20) Bartels EM, et al. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. Arthritis. 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
 - 21) van Ierssel SH, et al. Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. PLOS ONE 2012 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>.
 - 22) Urbina, A. et al. Reticulocyte count in red-blood-cell units stored in AS-1. Vox Sang, 2013 104: 331-336. <https://doi.org/10.1111/vox.12011>
 - 23) Ware RE, et al. Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 1995; 86 (4): 1586–1589. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V86.4.1586.bloodjournal8641586>.
 - 24) Payne D, et al. Inter-Laboratory Validation of a Harmonized PNH Flow Cytometry Assay. Cytometry Part B 2018; 94B: 736–743. Doi: 0.1002/cyto.b.21726

16.Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania

Podsumowanie bezpieczeństwa i działania będzie dostępne w bazie danych Eudamed pod adresem <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Do tego czasu podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i działania jest dostępne na żądanie.

17.Używanie znaków towarowych stron trzecich

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™ i FlowJo™ są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company. Cy™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Cytiva. VenturiOne® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Applied Cytometry. Infinicyt™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Cytognos S.L. SPHERO™ COMPTrol jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Spherotech, Inc.

18.Historia zmian

Wersja 4, ED7750_IFU_v4

- 1) Zaktualizowano rozdział „Próbka”.
- 2) Zaktualizowano przestrogi w rozdziale 10.
- 3) Zaktualizowano sekcje „3-kolorow-a próbówka PNH RBC” i „7-koloro-wa próbówka PNH WBC”, w tym rysunki w rozdziale 10.
- 4) Dodano sekcję „Kontrole wewnętrzne” w rozdziale 10.
- 5) Dodano ostrzeżenie w sekcji „Obliczanie i interpretacja wyników analitycznych”.
- 6) Zaktualizowano sekcję „Zasady algorytmu raportowania braków w GPI”.
- 7) Zaktualizowano rozdział 11 „Wydajność analityczna”.
- 8) Zaktualizowano sekcję „Ograniczenia”
- 9) Poprawiono numerację artykułów w sekcji „Bibliografia”.

19.Producent

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Republika Czeska

Dane kontaktowe

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

20.Upoważnieni przedstawiciele

N/A

UWAGA: każdy poważny incydent, który miał miejsce w związku z urządzeniem, należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi lokalnemu.