



DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit
25 Tests | Kat. Nr. ED7750

IVD **CE**₂₂₆₅

Gebrauchsanweisung (DE)

Version: ED7750_IFU_v4_DE
Ausgabedatum: 13-03-2026

In der Gerätekenzeichnung verwendete Symbole

IVD	Medizinisches Produkt für die In-vitro-Diagnose		Von Sonneneinstrahlung fernhalten
CE ₂₂₆₅	CE-Kennzeichnung ID-Nummer der benannten Stelle		Trocken aufbewahren
	Hersteller		Achtung
UDI	Eindeutige Gerätekennung		Nur für den einmaligen Gebrauch
	Gebrauchsanweisung beachten	TUBE	Enthält <n> Röhrchen für Einwegtests
	Ausreichend für <n> Tests	CONC 10x	Konzentrierte Lösung (10x)
REF	Katalognummer	CONTENTS	Inhalt
LOT	Chargencode	UKCA	UKCA-Zeichen
	Verfallsdatum		
	Temperaturgrenze		

1. Verwendungszweck

Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit ist für den hochempfindlichen Nachweis und die Zählung von Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-defizienten Zellen im menschlichen Vollblut mittels Durchflusszytometrie vorgesehen.

Was wird nachgewiesen und/oder gemessen?

Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit erkennt und zählt Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-defiziente Zellen (PNH-Klone) als Prozentsatz von:

- CD59 dim oder CD59- Zellen aus allen Erythrozyten (CD235a+)
- CD59 dim oder CD59- Zellen aus allen iRBC (CD235a+CD71+)
- CD14-, CD157- und GPI Ankerzellen aus allen Monozyten (CD45+CD64+)
- CD24-, CD157- und GPI Ankerzellen aus allen Neutrophilen (CD45+CD15+)

Funktion des Produkts

Das Gerät ist für die Diagnose und Überwachung von Patienten vorgesehen, die an paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH) und verwandten Erkrankungen leiden oder bei denen der Verdacht besteht, dass sie daran leiden ⁽¹⁾.

Kontext eines physiologischen oder pathologischen Zustands

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine seltene Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen, die als Folge der nicht bösartigen klonalen Expansion von Zellen mit somatischer Mutation des Phosphatidylinositol-Glycan-Anker-Biosynthese-Klasse-A(PIGA)-Gens entsteht. Mutationen des PIGA-Gens führen dazu, dass Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-verankerte Zelloberflächenproteine nicht exprimiert werden können.

Das Gerät soll GPI-defiziente Neutrophilen und Monozyten ⁽¹⁾ sowie vollständige (Typ III) und teilweise (Typ II) GPI-defiziente Erythrozyten ^(2,3,4,5,6) zur Beurteilung der PNH-Klongröße erkennen.

Darüber hinaus erkennt das Gerät GPI-defiziente iRBC (unreife Erythrozyten) bei Patienten, die Bluttransfusionen erhalten, wenn PNH-Erythrozyten schwer abzugrenzen sind ⁽⁷⁾.

Art des Tests

Nicht automatisiert

Quantitativ

Art der benötigten Probe

Humane antikoagulierte periphere Vollblutprobe (EDTA, Heparin, Citrat) ⁽¹⁾

Testpopulation

Patienten mit:

- Labormarker für Hämolyse, wenn andere häufigere Ursachen für Hämolyse ausgeschlossen wurden,
- ungeklärte Thrombosen im jungen Alter,
- diagnostizierte Thrombosen an einer ungewöhnlichen Stelle,
- vererbte oder erworbene aplastische Anämie (AA),
- myelodysplastisches Syndrom (MDS),
- ungeklärte Zytopenie, bei der AA oder MDS differenzialdiagnostisch in Frage kommen ⁽¹⁾

2. Vorgesehener Benutzer

Das Gerät ist nur für den professionellen Einsatz im Labor bestimmt. Nicht für patientennahe Tests oder Selbsttests geeignet.

Anforderungen an die Qualifikation

Der vorgesehene Benutzer muss über aktuelle Fachkenntnisse in der Durchflusszytometrie-Analyse menschlicher Zellen, standardmäßige Labortechniken, einschließlich Pipettieren, sowie den sicheren und korrekten Umgang mit Proben aus dem menschlichen Körper verfügen.

Der vorgesehene Benutzer muss die Norm EN ISO 15189 oder ggf. andere nationale Normen einhalten.

3. Testprinzip

Das Testprinzip basiert auf dem Nachweis von GPI-Anker und GPI-verankerten Proteinen auf der Oberfläche menschlicher Blutzellen. Die in dem Test verwendeten monoklonalen Antikörper und das rekombinante Proaerolysin sind mit verschiedenen Fluorochromen markiert, die durch einen Laserstrahl eines Durchflusszytometers während der Erfassung einer gefärbten Blutprobe angeregt werden. Die anschließend erzeugte Fluoreszenz (Lichtemission) der einzelnen Fluorochrome auf einer aufgenommenen Blutzelle wird vom Gerät erfasst und analysiert. Die Stärke der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Dichte der Antigenexpression in einer Zelle und ermöglicht die Trennung verschiedener Zelluntergruppen.

4. Bereitgestellte Reagenzien

Inhalt

Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, das für die Untersuchung von 25 Patienten ausreicht, wird mit den folgenden Reagenzien geliefert:

PNH High-Sensitivity Assay (25 Beutel). Jeder Beutel enthält ein farbcodiertes (cyanfarbener Streifen) verschlossenes Einwegröhrchen **PNH WBC 7-color**

(ED7750-1) und ein farbcodiertes (roter Streifen) verschlossenes Einwegröhrchen **PNH RBC 3-color** (ED7750-2) mit vorgemischten Kombinationen aus Fluorochrom-markierten Reagenzien, die mit den stabilisierenden Bestandteilen als Schicht am Boden der Teströhrchen (12 x 75 mm) getrocknet sind (siehe Tabelle 1 und 2).

Lysing Solution ED7750-3 (1 Flasche) enthält 15 ml konzentrierte (10X) gepufferte Lösung auf Formaldehydbasis.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 Beutel) mit 10 verschlossenen Einwegröhrchen, die jeweils ein einzelnes Fluorochrom-markiertes Reagenz enthalten, getrocknet mit den stabilisierenden Bestandteilen als Schicht am Boden des Röhrchens (12 x 75 mm).

VORSICHT: Das PNH Compensation Set ist nur für die Einrichtung der Kompensation bestimmt. Einzelne Fluorochrom-markierte Reagenzien (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2) ermöglichen ein einfaches und genaues Kompensationsverfahren.

Zusammensetzung

Tabelle 1 Beschreibung der Wirkstoffe von PNH WBC 7-color

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp
GPI- Anker (Proaerolysin)	Alexa Fluor®488	N/A	N/A
CD157	PE	SY11B5	IgG1
CD45	PerCP-Cy™5.5	2D1	IgG1
CD64	PE-Cy™7	10.1	IgG1
CD24	APC	SN3	IgG1
CD14	APC-Cy™7	MEM-15	IgG1
CD15	Pacific Blue™	MEM-158	IgM

Tabelle 2 Beschreibung der Wirkstoffe von PNH RBC 3-color

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Deionisiertes Wasser (Reagenzienqualität)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1X PBS), pH 7,2–7,4

Durchflusszytometrie-Kompensationspartikel (Spherotech SPHERO™ COMPtrol Kit, Kat.-Nr. CMIgP-50-3K oder gleichwertige Kompensationspartikel)

6. Erforderliche Ausrüstung

Automatische Pipette mit Einwegspitzen (100 µl – 5 ml) zum Pipettieren der Proben und Reagenzien

Flüssigkeitsspender oder Pipette mit Einwegspitzen (2 ml) für die Abgabe der Erythrozytenlyselösung

Vortex-Mixer

Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (15 ml oder 50 ml) zur Probenvorbereitung

Zentrifuge mit passenden Rotoradaptern für 12 x 75 mm Rundbodenröhrchen

Durchflusszytometer mit drei Laseranregungsquellen (488 nm, ca. 635 nm und 405 nm), Detektoren für Streulicht, optische Filter und Emissionsdetektoren, die für die Erfassung der Signale der in Tabelle 3 aufgeführten Fluorochrome ausgelegt sind.

Tabelle 3 Spektrumscharakteristik der in dem Gerät verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Anregung [nm]	Emission [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

HINWEIS: Das Gerät wurde auf folgenden Durchflusszytometern getestet: BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter) und DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Lagerung und Handhabung

Bei 20–30 °C aufbewahren.

Längere Lichteinwirkung vermeiden.

Trocken aufbewahren.

VORSICHT: Feuchtigkeitsempfindliches Produkt. Den Folienbeutel erst bei der ersten Verwendung öffnen.

Siehe Abschnitt 10 Verfahren (Vorbereitung der bereitgestellten Reagenzien) für Informationen zu den Lagerbedingungen und der Stabilität von Arbeitslösungen (sofern zutreffend).

8. Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen bei der Anwendung

GHS-Gefahrenklassifizierung

WARNUNG: Lysing Solution (ED7750-3) mit Formaldehyd (CAS-Nr. 50-00-0) und Methanol (CAS-Nr. 67-56-1) in als gefährlich eingestuft Konzentrationen.

Etikettenelemente	Signalwort
	Gefahr
	
H-Sätze	H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H315: Verursacht Hautreizungen. H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H331: Giftig bei Einatmen. H335: Kann die Atemwege reizen. H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. H350: Kann Krebs erzeugen. H371: Kann die Organe schädigen. H373: Kann an den Nieren schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition bei Verschlucken. EUH071: Wirkt ätzend auf die Atemwege.
P-Sätze	P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P260: Dampf nicht einatmen. P280: Schutzhandschuhe/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat

	einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P403+P233: An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.
--	---

Beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheet/SDS) auf der Produktseite auf www.exbio.cz. Dort finden Sie alle Informationen zu den Risiken, die von den im Produkt enthaltenen chemischen Stoffen und Gemischen ausgehen, und dazu, wie diese gehandhabt und entsorgt werden sollten.

Biologisches Risiko

Menschliche biologische Proben und Blutproben sowie alle damit in Kontakt kommenden Materialien werden immer als infektiöses Material betrachtet.

Verwenden Sie eine persönliche Schutz- und Sicherheitsausrüstung, um den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten zu vermeiden.

Befolgen Sie alle geltenden Gesetze, Vorschriften und Verfahren für den Umgang mit und die Entsorgung von infektiösem Material.

Anzeichen von Verfall

Das mitgelieferte Reagenz ist normalerweise eine transparente, getrocknete Schicht auf dem Boden des Röhrchens. Verwenden Sie das Reagenz nicht, wenn Sie eine Veränderung des Aussehens feststellen, z. B. Feuchtigkeit im Inneren des Röhrchens.

Beschränkung der Verwendung

Do not use after the expiry date stated on the product labels.

Teströhrchen nicht wiederverwenden.

9. Probe

Verwenden Sie venöses peripheres Blut, das in einem als Medizinprodukt eingestuftten Probenbehälter mit dem Antikoagulans EDTA, Heparin oder ACD (Acid Citrate Dextrose) entnommen wurde ⁽¹⁾.

Nur unbehandelte Proben verwenden. Keine vorlysierten, gewaschenen oder verdünnten Proben verwenden.

Verarbeiten Sie die Blutprobe innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme. Bewahren Sie die Probe bei Labortemperatur (20–25 °C) auf, wenn sie innerhalb von 24 Stunden verarbeitet wird. Wenn sich die Verarbeitung um mehr als 24 Stunden, aber weniger als 48 Stunden verzögert, bewahren Sie die Probe gekühlt auf ⁽¹⁾.

Endogene Interferenz

Basierend auf wissenschaftlicher Literaturrecherche werden endogene Störquellen in Tabelle 4 identifiziert.

Tabelle 4 Endogene Interferenz des Geräts

Endogene Interferenz	Auswirkungen	Referenz
Albumin	Albumin kann in hohen Konzentrationen aufgrund seiner Fähigkeit, große Mengen an Liganden zu binden und freizusetzen, störend wirken.	9, 10, 11
Bilirubin (Ikterus) (unkonjugiert)	Bilirubin erhöht aufgrund seiner hohen Autofluoreszenz den Fluoreszenzhintergrund von Zellen.	12, 13, 14
Zelltrümmer (nach der Lyse)	Zelltrümmer können zu ungenauen Zellzahlen führen und die Antikörper im Gerät verringern.	15, 16
Erythrozyten	Unzureichende Lyse, in der Probe vorhandene rote Blutkörperchen können zu einer fehlerhaften Zellzählung führen.	17
Hämoglobin	Hämolysierte Proben können unzuverlässige Ergebnisse liefern.	18
Humane Anti-Maus-Antikörper	Kann die Gerätefunktionalität beeinträchtigen (Fähigkeit zur Bindung an Zelloberflächenantigene).	19
Immunglobuline	Kann die Anzahl der Lymphozyten-Subsets beeinflussen.	12
Rheumafaktoren	Das Vorhandensein von RF beeinträchtigt MIA (Multiplex-Immunoassays).	20
Triglyceride	Hohe zirkulierende Lipidwerte können die Durchflusszytometrieanalyse bestimmter Blutzellpopulationen beeinträchtigen.	21

Exogene Interferenz

Nach den Veröffentlichungen von Sutherland et. al.⁽⁷⁾ stellen rote Blutkörperchen aus Bluttransfusionen bei Patienten mit einem großen PNH-Klon und extravaskulärer Hämolysen eine wesentliche Störung der PNH-Analyse dar. Durch Transfusion erhaltene gesunde Erythrozyten beeinflussen die Überwachung des PNH-Klons in der Erythrozytenlinie (RBC) erheblich. Durch die Zugabe von CD71 lässt sich die Größe von PNH-Klonen in der RBC-Linie unabhängig vom Hämolysen- und/oder Transfusionsstatus des Patienten deutlich besser analysieren. Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit überwindet dieses Problem gemäß den vorgenannten Richtlinien durch die Bereitstellung des CD71-Antigens zur Identifizierung unreifer Erythrozyten (iRBC), wobei iRBCs auch das GPI-verankerte CD59-Antigen exprimieren. In Transfusionsbeuteln sind iRBCs üblicherweise in sehr geringer Menge vorhanden⁽²²⁾. Andererseits ist bei Patienten mit

extravaskulärer Hämolyse aufgrund von PNH die Anzahl der iRBCs aufgrund des schnellen Verlusts von Erythrozyten erhöht ⁽²³⁾. Durch die Zugabe des monoklonalen CD71-Antikörpers zur Identifizierung von iRBCs steht dem Arzt somit eine genauere Überwachung des PNH-Fortschritts zur Verfügung. Der Verlust des CD59-Antigens auf den iRBCs wird dabei nicht durch exogene Erythrozyten aus Transfusionsbeuteln beeinflusst. Das DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit enthält einen Anti-Human-CD71-Antikörper und ermöglicht die Verwendung der neuesten Richtlinien zur Erkennung und Quantifizierung von PNH-Klonen.

10.Vorgehensweise

Vorbereitung der mitgelieferten Reagenzien

PNH High-Sensitivity Assay

Es ist keine Vorbereitung der Reagenzien erforderlich, sie werden in Teströhrchen zum einmaligen Gebrauch geliefert.

Lysing Solution

Bringen Sie das Reagenz vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Das Reagenz ist 10-fach konzentriert und muss vor der Anwendung mit deionisiertem Wasser verdünnt werden (1 Volumen der konzentrierten Lösung und 9 Volumen deionisiertes Wasser). Nach dem ersten Öffnen behält das Reagenz seine Eigenschaften bis zum Verfallsdatum, wenn es unter den angegebenen Bedingungen in seinem ursprünglichen Primärbehälter gelagert wird.

Die verdünnte Lyselösung (1X) ist 1 Monat lang haltbar, wenn sie in einem Flüssigkeitsspender oder einem geschlossenen Behälter bei Raumtemperatur aufbewahrt wird.

Vorbereitung der erforderlichen, aber nicht bereitgestellten Materialien

Kompensationspartikel

Bereiten Sie die Arbeitslösung der Durchflusszytometrie-Kompensationspartikel gemäß den Anweisungen des Herstellers vor.

Einrichtung der Kompensation

Nehmen Sie die Röhrchen des Kompensationssets mit demselben Durchflusszytometer-Setup auf, bevor Sie die mit PNH RBC 3-color und PNH WBC 7-color gefärbten Röhrchen analysieren.

VORSICHT: Die Kompensationsverfahren für PNH RBC 3-color und PNH WBC 7-color unterscheiden sich in der Art der Probenvorbereitung und Probenfärbung.

PNH RBC 3-color Kompensationsröhrchen (roter Streifen)

1. Geben Sie **das SPHERO™ COMPTrol Kit oder gleichwertige Kompensationspartikel** in den Boden der einzelnen einfarbigen Kompensationsröhrchen.
2. Vortexen Sie und inkubieren Sie für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
3. Geben Sie 4 ml 1X PBS in jedes Kompensationsröhrchen. 5 Minuten bei 300×g zentrifugieren.
4. Verwerfen Sie den Überstand, ohne die Kompensationspartikel zu beeinträchtigen, und geben Sie 0,1 ml 1X PBS in jedes Kompensationsröhrchen.
5. Stellen Sie vor der Analyse der gefärbten Proben die Spannungen an den entsprechenden Fluoreszenzdetektoren ein. Die Spannung am PMT-Detektor sollte ausreichend hoch eingestellt sein, damit möglichst wenige negativ gefärbte Ereignisse den 0. Kanal auf der Fluoreszenzachse stören. Außerdem sollte die Spannung des PMT-Detektors nicht die Werte überschreiten, bei denen positive Ereignisse auf die rechte Achse gedrückt werden.
6. Messen Sie die Kompensationsröhrchen sofort mit dem Durchflusszytometer.
7. Berechnen Sie die Kompensationsmatrix für PNH RBC 3-color entweder in der vom Hersteller entwickelten Zytometersoftware oder in einer speziellen Software für die Offline-Analyse von Zytometriedaten. Verwenden Sie diese Kompensationsmatrix für alle Teströhrchen dieser Charge von PNH RBC 3-color.

VORSICHT: Sobald Sie die Einstellungen für eine bestimmte Charge von PNH RBC 3-color vorgenommen haben, sollten Sie die Einstellungen der Fluoreszenzdetektoren nicht mehr ändern, um die gleichen Einstellungen für die Erfassung der Kompensationsmatrix und die Kompensationsergebnisse beizubehalten.

PNH WBC 7-color Kompensationsröhrchen (cyanfarbener Streifen)

1. Geben Sie 50 µl entionisiertes Wasser in den Boden jedes einfarbigen Kompensationsröhrchens und vortexen Sie 7–10 Sekunden lang kräftig.
2. Geben Sie **100 µl peripheres Vollblut in jedes einfarbige Kompensationsröhrchen** und vortexen Sie kräftig.
3. 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
4. Geben Sie 2 ml verdünnte (1X) Lyselösung in jedes Kompensationsröhrchen.

5. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
6. Zentrifugieren Sie es für 5 Minuten bei 300×g, werfen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Zellpellet in 2 ml 1X PBS.
7. Zentrifugieren Sie es für 5 Minuten bei 300×g, werfen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Zellpellet in 0,2 ml 1X PBS.
8. Stellen Sie vor der Analyse der gefärbten Proben die Spannungen an den entsprechenden Fluoreszenzdetektoren ein. Die Spannung am PMT-Detektor sollte ausreichend hoch eingestellt sein, damit möglichst wenige negativ gefärbte Ereignisse den 0. Kanal auf der Fluoreszenzachse stören. Außerdem sollte die Spannung des PMT-Detektors nicht die Werte überschreiten, bei denen positive Ereignisse auf die rechte Achse gedrückt werden.
9. Messen Sie die Kompensationsröhrchen sofort mit dem Durchflusszytometer.
10. Berechnen Sie die Kompensationsmatrix für PNH WBC 7-color entweder in der vom Hersteller entwickelten Zytometersoftware oder in einer speziellen Software für die Offline-Analyse von Zytometriedaten. Verwenden Sie diese Kompensationsmatrix für alle Teströhrchen dieser Charge von PNH WBC 7-color.

VORSICHT: Sobald Sie die Einstellungen für eine bestimmte Charge von PNH WBC 7-color vorgenommen haben, sollten Sie die Einstellungen der Fluoreszenzdetektoren nicht mehr ändern, um die gleichen Einstellungen für die Erfassung der Kompensationsmatrix und die Kompensationsergebnisse beizubehalten.

Probenvorbereitung

Nachweis und Differenzierung von PNH-Klonen in Erythrozyten mittels PNH RBC 3-color-Röhrchen erfordern vor dem Färbevorgang eine Probenvorbereitung.

HINWEIS: Stellen Sie vor der Verarbeitung der Probe sicher, dass das Zytometer ordnungsgemäß eingerichtet wurde.

1. Kennzeichnen Sie ein konisches Polypropylenröhrchen mit der Identifizierung der untersuchten Blutprobe.
2. Pipettieren Sie 10 µl der gründlich gemischten Blutprobe auf den Boden des gekennzeichneten konischen Röhrchens.
3. Verdünnen Sie die Blutprobe 1:100 mit 1 ml 1X PBS und mischen Sie sie 5 Sekunden lang mit der Hand.

VORSICHT: Bei der klassischen Form der PNH dominiert die intravaskuläre Hämolyse. Ziehen Sie vor der Verdünnung der Blutprobe die Erythrozytenzahlen des Hämatologie-Analysegeräts heran, um eine

Erythrozytenzahl in der verdünnten Blutprobe im Bereich von $3-5 \times 10^7$ / ml verdünntem Blut zu erreichen, und passen Sie den Verdünnungsfaktor nach Bedarf an, um eine ausreichende Anzahl von Erythrozyten im Durchflusszytometer zu erhalten.

4. Fahren Sie unmittelbar nach der Probenverdünnung mit dem Verfahren zur Probenfärbung fort.

Nachweis von GPI-defizienten Zellen in Neutrophilen und Monozyten mittels PNH WBC 7-color-Röhrchen erfordern vor dem Färbevorgang eine Probenvorbereitung.

Probenfärbung – PNH RBC 3-color-Röhrchen (roter Streifen)

1. Kennzeichnen Sie das PNH RBC 3-color-Röhrchen mit der Identifizierung der untersuchten Blutprobe.
2. **Pipettieren Sie 50 µl der gründlich gemischten und verdünnten Blutprobe** in den Boden des PNH RBC 3-color-Röhrchens.

VORSICHT: Pipettieren Sie das Blut nicht auf die Seiten des Teströhrchens. Bleibt ein Blutausschlag oder -tropfen an der Seite des Röhrchens zurück, wird er nicht mit dem Reagenz gefärbt und die Testergebnisse sind unter Umständen nicht gültig.

3. Vortexen Sie kräftig für 7–10 Sekunden.
VORSICHT: Bei einer Verkürzung der Vortex-Zeit können die Testergebnisse beeinträchtigt werden.
4. Das PNH RBC 3-color-Röhrchen 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
5. Geben Sie 4 ml 1X PBS in das PNH RBC 3-color-Röhrchen.
6. Zentrifugieren Sie das PNH RBC 3-color-Röhrchen für 5 Minuten bei 300×g.
7. Verwerfen Sie den Überstand, ohne das Zellpellet zu beeinträchtigen, und geben Sie 0,5 ml 1X PBS in das PNH RBC 3-color-Röhrchen.
8. Vortexen Sie kurz, um das Zellpellet zu resuspendieren.

Messen Sie die gefärbte Probe mit dem Durchflusszytometer. Wird die gefärbte Probe nicht sofort gemessen, verschließen Sie das Teströhrchen, lagern Sie sie bei 2–8 °C im Dunkeln und analysieren Sie sie innerhalb von 2 Stunden.

VORSICHT: Brechen Sie Zellaggregate in der gefärbten Probe auf, indem Sie das Teströhrchen unmittelbar vor der Erfassung auf dem Durchflusszytometer 6–10 Mal gegen die Oberseite des Röhrchengestells schieben. Eine übermäßige Menge an Erythrozytenaggregaten kann die Testergebnisse beeinträchtigen.

Probenfärbung – PNH WBC 7-color-Röhrchen (cyanfarbener Streifen)

1. Kennzeichnen Sie das PNH WBC 7-color-Röhrchen mit der Identifizierung der untersuchten Blutprobe.
2. Geben Sie **50 µl entionisiertes Wasser** in das PNH WBC 7-color-Teströhrchen. Vortexen Sie kräftig für 7–10 Sekunden.

VORSICHT: Bei einer Verkürzung der Vortex-Zeit können die Testergebnisse beeinträchtigt werden.

3. Pipettieren Sie **100 µl der gründlich gemischten Blutprobe** in den Boden des PNH WBC 7-color-Röhrchens und vortexen Sie kräftig.

VORSICHT: Pipettieren Sie das Blut nicht auf die Seiten des Teströhrchens. Wenn ein Blutausschlag oder -tropfen an der Seite des Teströhrchens verbleibt, wird er nicht mit dem Reagenz gefärbt und die Testergebnisse sind unter Umständen nicht gültig.

4. 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
5. Geben Sie 2 ml der 1X Erythrozyten-Arbeitslyselösung zum Lysieren von Erythrozyten in das PNH WBC 7-color-Röhrchen.
6. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
7. Zentrifugieren Sie das PNH WBC 7-color-Röhrchen für 5 Minuten bei 300×g.
8. Verwerfen Sie den Überstand, ohne das Zellpellet zu beeinträchtigen, und geben Sie 2 ml 1X PBS in das Teströhrchen.
9. Zentrifugieren Sie das PNH WBC 7-color-Röhrchen für 5 Minuten bei 300×g.
10. Verwerfen Sie den Überstand, ohne das Zellpellet zu beeinträchtigen, und geben Sie 0,2 ml 1X PBS in das Teströhrchen.
11. Vortexen Sie kurz, um das Zellpellet zu resuspendieren.

Messen Sie die gefärbte Probe mit dem Durchflussszytometer. Wird die gefärbte Probe nicht sofort gemessen, verschließen Sie das Teströhrchen, lagern Sie sie bei 2–8 °C im Dunkeln und analysieren Sie sie innerhalb von 24 Stunden.

Durchflusszytometrie-Analyse

Das für die Verwendung mit dem DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit ausgewählte Durchflusszytometer muss routinemäßig mit fluoreszierenden Mikrokügelchen kalibriert werden, um eine stabile Empfindlichkeit der Detektoren gemäß den Anweisungen des Herstellers des Zytometers sicherzustellen.

Bei unsachgemäßer Wartung kann das Durchflusszytometer falsche Ergebnisse liefern.

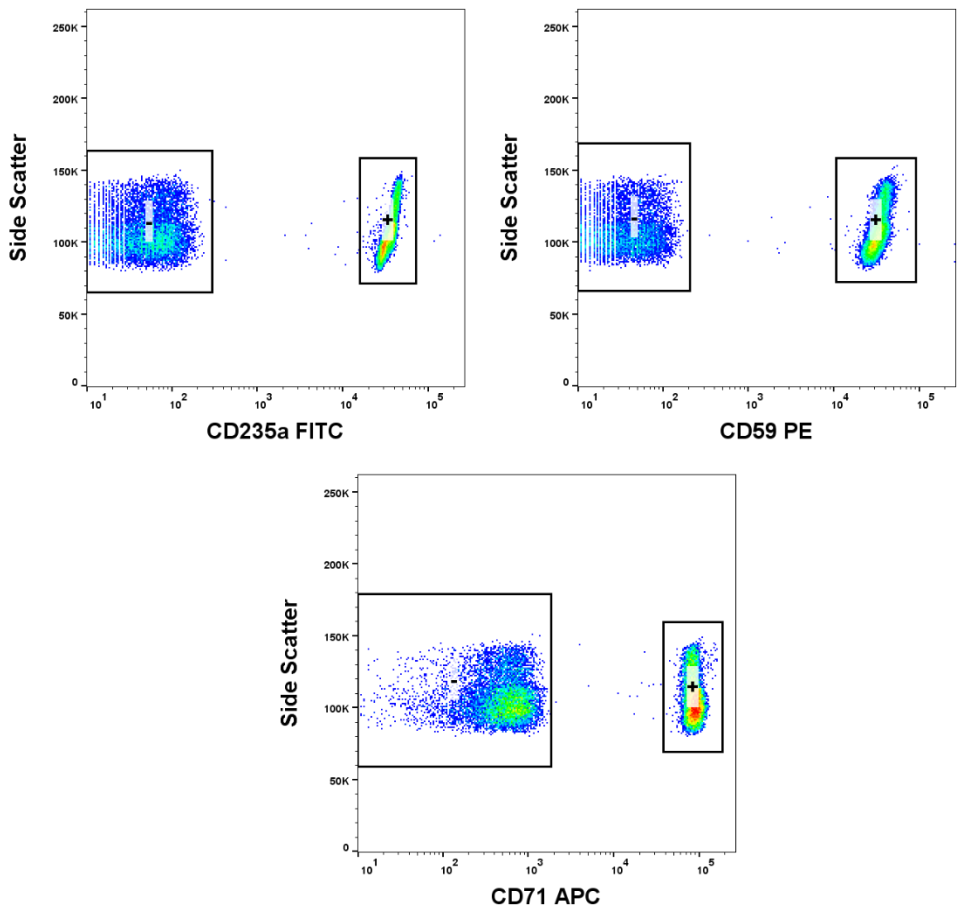
Beachten Sie die Herstellerangaben des Zytometers für Laser und Fluoreszenzdetektoren entsprechend den Anregungs- und Emissionscharakteristiken der Fluorochrome in Abschnitt 6 „Erforderliche Ausrüstung“.

Zur Analyse der Messdaten können die vom Hersteller entwickelte Zytometer-Software oder eine spezielle Software für die Offline-Analyse von Zytometriedaten verwendet werden (z. B. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analyse von PNH RBC 3-color Kompensationsröhrchen (roter Streifen)

Stellen Sie die nicht kompensierten Daten für jedes Kompensationsröhrchen in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung (SSC) gegen das zu kompensierende Fluorochrom dar. Setzen Sie die Gates für positive (+) und negative (-) Zytometrie-Kompensationspartikel wie in Abbildung 1 gezeigt.

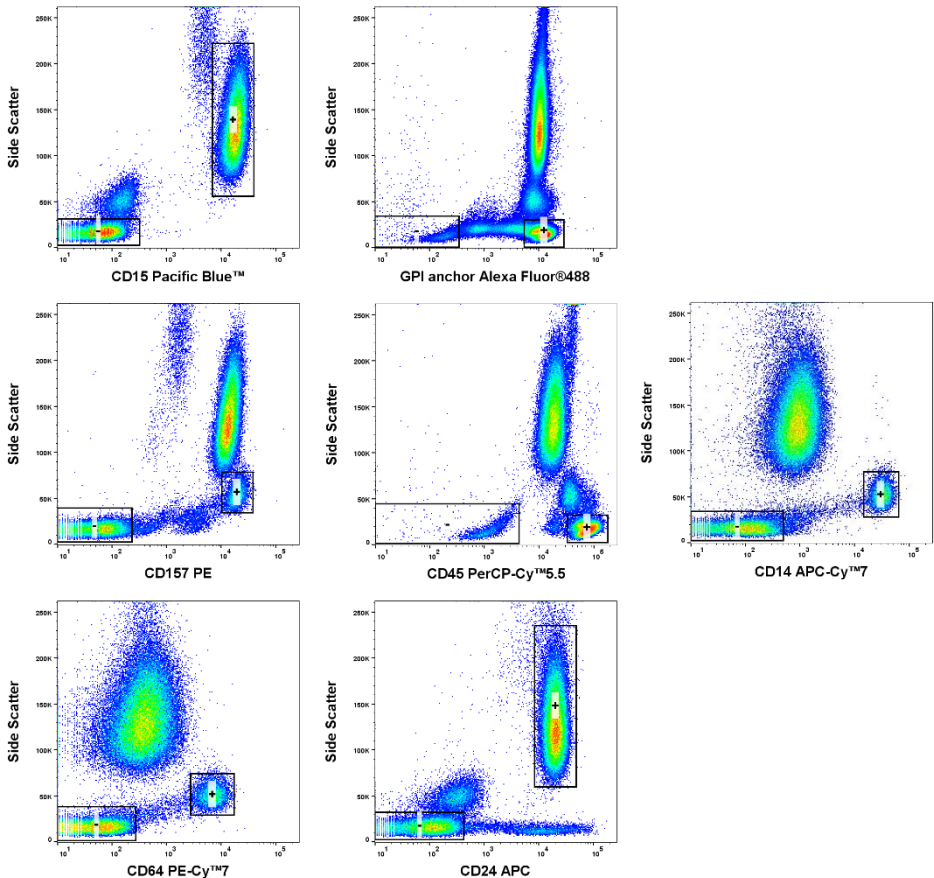
Abbildung 1 Identifizierung von positiven (+) und negativen (-) Zytometrie-Kompensationspartikeln in Kompensationsröhrchen (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



Analyse von PNH WBC 7-color Kompensationsröhrchen (cyanfarbener Streifen)

Stellen Sie die nicht kompensierten Daten für jedes Kompensationsröhrchen in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung (SSC) gegen das zu kompensierende Fluorochrom dar. Setzen Sie die Gates für die positivsten (+) und negativsten (-) Populationen wie in Abbildung 2 gezeigt.

Abbildung 2 Identifizierung der positivsten (+) und negativsten (-) Ereignisse in Kompensationsröhren (Daten, die mit BD FACSCanto™ II erfasst wurden).



PNH RBC 3-color-Röhrchen (roter Streifen)

Aufgrund der geringen iRBC-Zahl in verdünnten Blutproben sollten mindestens 500.000 Erythrozytenereignisse für die Analyse erfasst werden. Die Erfassung von ≥ 500.000 Ereignissen führt zu langen Erfassungszeiten. Dies kann das Gleichgewicht des Antikörper-Antigen-Bindungskomplexes und die Abnahme der CD235a-FITC-Fluoreszenz beeinträchtigen. Überwachen Sie stets die Stabilität der Fluoreszenzintensität über die Erfassungszeit (Abbildung 3).

Abbildung 3 Überprüfen Sie alle erfassten Ereignisse in einem Punktdiagramm, Zeit vs. CD235a FITC (Daten erfasst auf einem BD FACSLytic™).

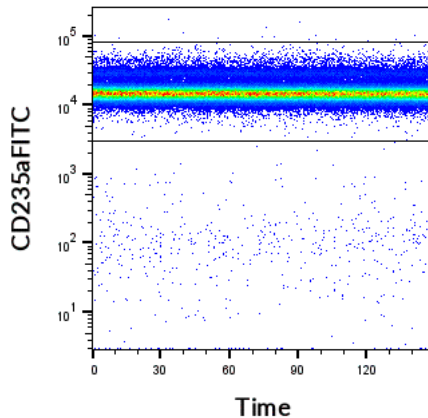
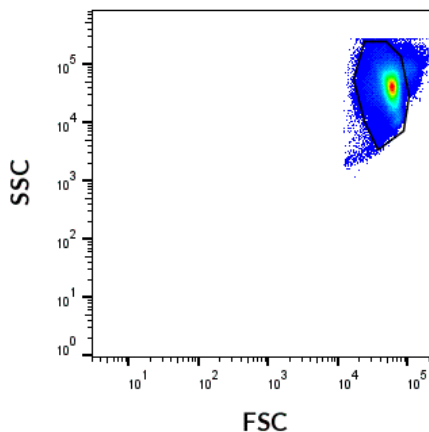
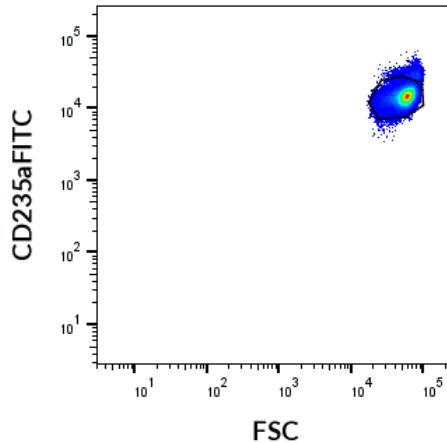


Abbildung 3a Zeigen Sie alle Ereignisse aus dem Zeit-Gate in einem Punktdiagramm FSC-A vs. SSC-A im logarithmischen Modus an (Daten erfasst auf einem BD FACSLytic™).



Visualisieren Sie kompensierte Daten aus dem SSC- vs. FSC-Gate in einem Punktdiagramm im logarithmischen Modus, wobei die X-Achse den FSC und die Y-Achse die Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal darstellt. Setzen Sie das Gate „CD235a+ RBC-Singulett“ (Abbildung 4).

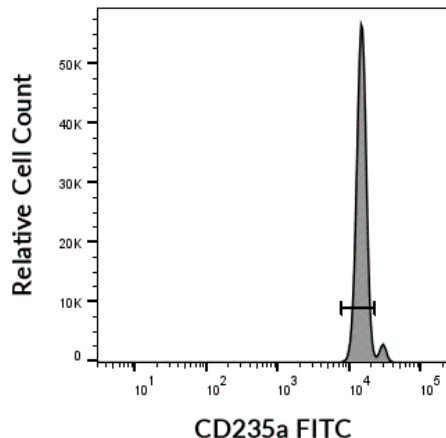
Abbildung 4 Abgrenzung von CD235a+ RBC-Singulett (Daten erfasst auf einem BD FACSLytic™).



Optional:

Zur besseren Unterscheidung von Singulett können die kompensierten Daten als Histogramm dargestellt werden, wobei die X-Achse die Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal darstellt. Setzen Sie das Gate „CD235a+ RBC-Singulett“ (Abbildung 4a).

Abbildung 4a Abgrenzung von CD235a+ RBC-Singulett (Daten erfasst auf einem BD FACSLytic™).



Erythrocytes

Stellen Sie CD235a+ RBC-Singulettten in einem Punktdiagramm von CD59 PE vs. CD235a FITC dar. Teilen Sie die Ereignisse mithilfe von drei geeigneten Gates in drei Populationen auf (Abbildung 5a, 5b) und berechnen Sie den Prozentsatz der Ereignisse in den Regionen Typ I, Typ II und Typ III. Zur besseren Anpassung der Bereiche zwischen Typ II und III kann in manchen Situationen ein Histogramm nützlich sein.

Abbildung 5a Patient mit PNH-Klon: A) CD235a+ RBC-Singulettten in einem Punktdiagramm CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD235a+ RBC-Singulettten in einem CD59 PE vs. Histogramm (Daten erfasst auf einem BD FACSLyric™).

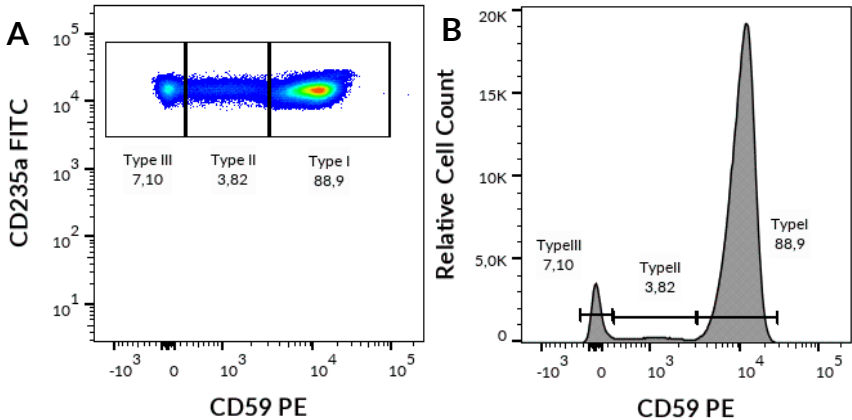
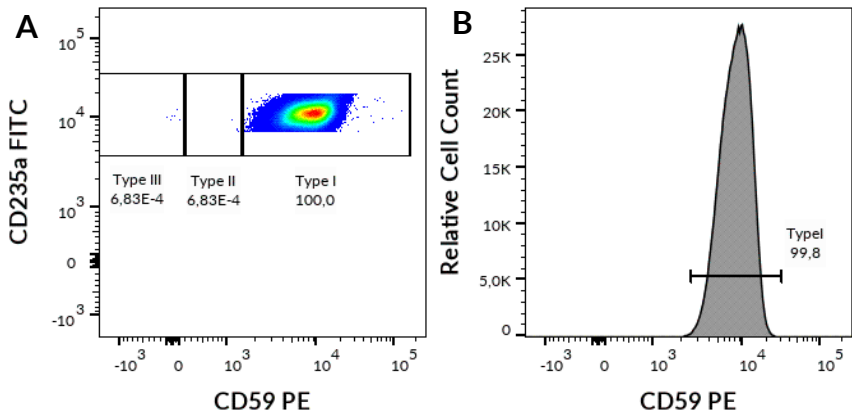


Abbildung 5b Gesunder Spender: A) CD235a+ RBC-Singulettten in einem Punktdiagramm CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD235a+ RBC-Singulettten in einem CD59 PE vs. Histogramm (Daten erfasst auf einem BD FACSLyric™).

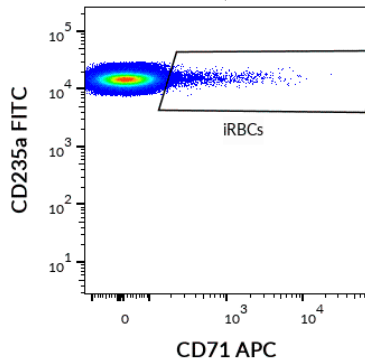


iRBCs (unreife Retikulozyten)

Bei Patienten, die Bluttransfusionen erhalten, kann die Bestimmung des tatsächlichen Anteils an PNH-Typ-II- und -III-Erythrozyten schwierig sein. Gesunde Erythrozyten eines Blutspenders, die im Blutkreislauf eines PNH-Patienten zirkulieren, beeinflussen den genauen Prozentsatz der PNH-Klon-Größe. Die Zugabe von CD71 kann hilfreich sein, um die transfundierten Zellen des Spenders auszugaten ⁽⁶⁾.

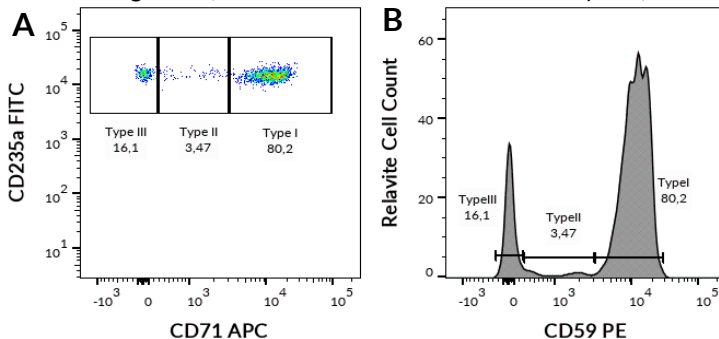
Stellen Sie CD235a+ RBC-Singulett in einem Punktdiagramm von CD71 APC vs. CD235a FITC dar und trennen Sie die CD71+ iRBCs (Abbildung 6).

Abbildung 6 CD235a+ RBC-Singulett in einem Punktdiagramm CD71 APC vs. CD235a FITC. Abgrenzung von CD71+ iRBCs (Daten, die mit BD FACSLyric™ erfasst wurden).



Visualisieren Sie CD71+ iRBCs in einem Punktdiagramm CD59 PE vs. CD235a FITC und in einem CD59 PE vs. Histogramm (Abbildung 7). Teilen Sie die Ereignisse mithilfe von drei geeigneten Gates in drei Populationen auf und berechnen Sie den Prozentsatz der Ereignisse in den Regionen Typ I, Typ II und Typ III.

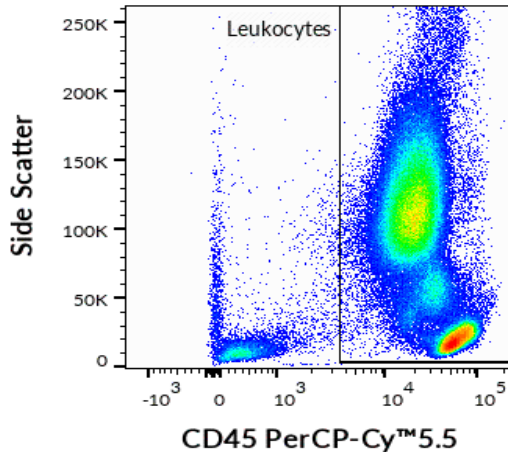
Abbildung 7 Patient mit PNH-Klon, aber ohne Transfusion: A) CD71+ iRBCs in einem Punktdiagramm CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD71+ iRBCs in einem CD59 PE vs. Histogramm (Daten erfasst auf einem BD FACSLyric™).



PNH WBC 7-color-Röhrchen (cyanfarbener Streifen)

Erfassen Sie mindestens 50.000 Neutrophile und 10.000 Monozyten, was mindestens 200.000 Ereignisse für die Analyse erfasst werden müssen. Visualisieren Sie kompensierte Daten im S-Punktdiagramm mit Seitenstreuung im Vergleich zu Fluoreszenzintensität in PerCP-Cy™ 5.5. Setzen Sie das Gate für CD45+ Leukozyten wie in Abbildung 8 gezeigt ein.

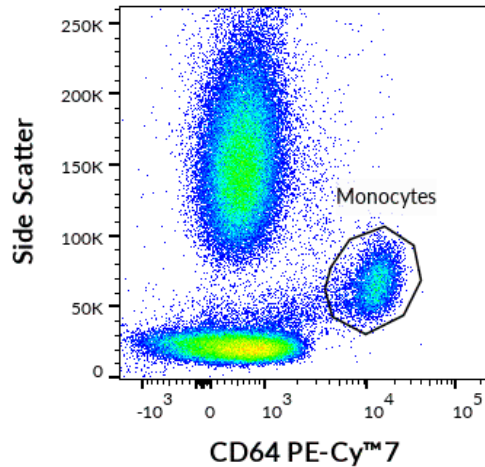
Abbildung 8 Abgrenzung von CD45+ Leukozyten (Daten, die mit BD FACSLytic™ erfasst wurden).



Monozyten

Stellen Sie die CD45⁺ Leukozyten in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung gegen CD64 PE-CyTM7 dar und grenzen Sie die CD64⁺ Monozyten ab, wie in Abbildung 9 gezeigt.

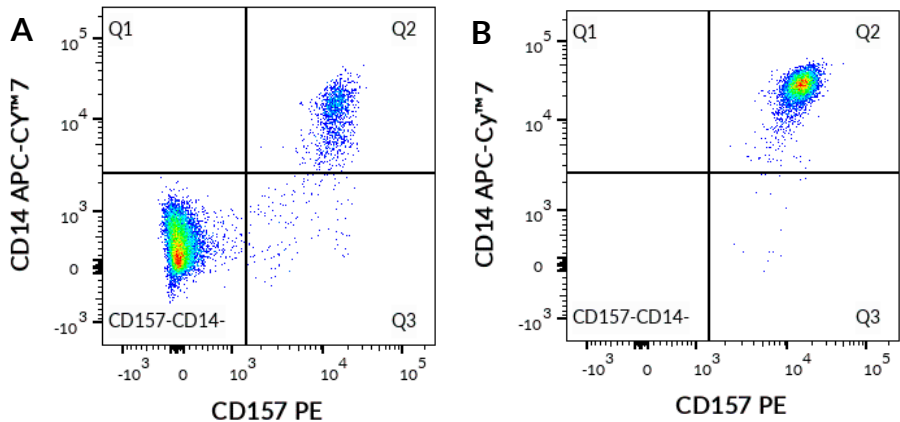
Abbildung 9 Abgrenzung von CD64⁺ Monozyten von Leukozyten (Daten, die mit BD FACSLyticTM erfasst wurden).



Stellen Sie die CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm von CD157 PE vs. CD14 APC-Cy™7 (Abbildung 10) dar. Setzen Sie geeignete Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der CD157-CD14-Population.

Abbildung 10 CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm CD157 PE vs. CD14 APC-Cy™7 (Daten, die mit BD FACSLytic™ erfasst wurden).

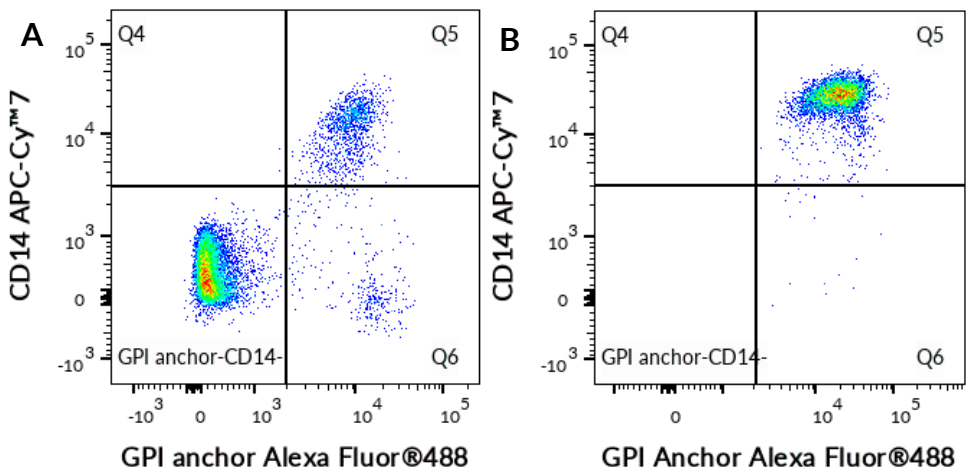
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Visualisieren Sie dann dieselben CD64+-Monozyten in einem Punkt-diagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) vs. CD14 APC-Cy™7 (Abbildung 11). Setzen Sie geeignete Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker-CD14-Population.

Abbildung 11 CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 vs. CD14 APC-Cy™7 (Daten, die mit BD FACSLytic™ erfasst wurden).

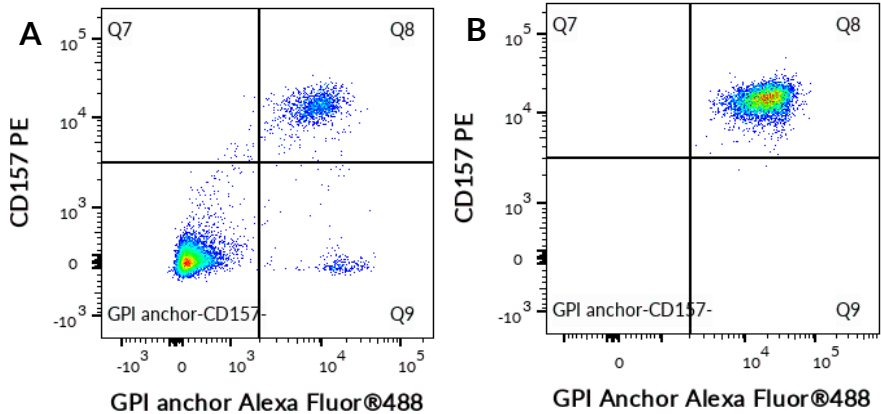
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Stellen Sie dann dieselben CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) im Vergleich zu CD157 PE (Abbildung 12) dar. Setzen Sie geeignete Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker-CD157-Population.

Abbildung 12 CD64+ Monozyten in einem Punktdiagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 vs. CD157 PE (Daten, die mit BD FACSLytic™ erfasst wurden).

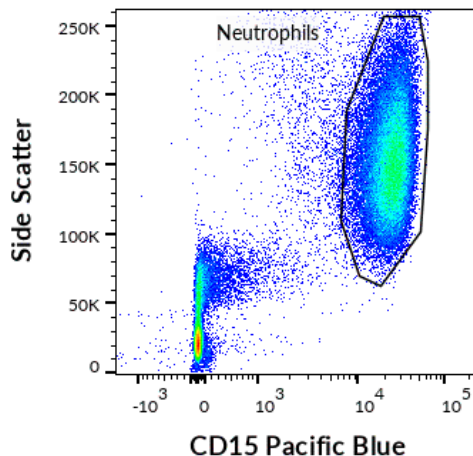
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Neutrophile

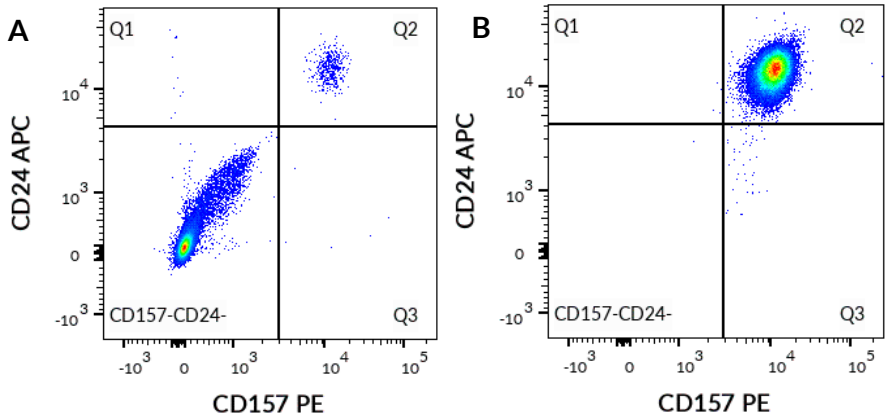
Stellen Sie die CD45+ Leukozyten in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung gegen CD15 Pacific Blue™ dar und grenzen Sie CD15+ Neutrophile wie in Abbildung 13 gezeigt.

Abbildung 13 Abgrenzung von CD15+ Neutrophilen von Leukozyten (Daten, die mit BD FACSLytic™ erfasst wurden).



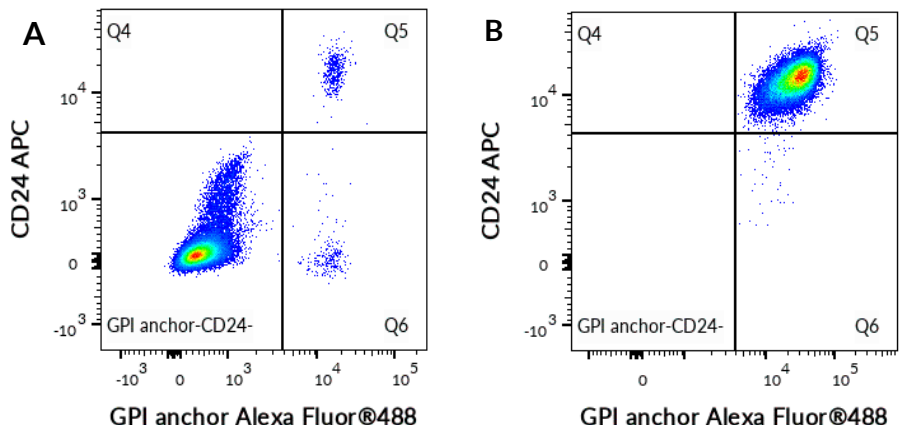
Stellen Sie die CD15+ Neutrophile in einem Punktdiagramm von CD157 PE vs. CD24 APC dar, wie in Abbildung 14 gezeigt. Setzen Sie entsprechende Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der CD157-CD24- Population.

Abbildung 14 CD15+ Neutrophile in einem Punktdiagramm CD157 PE vs. CD24 APC (Daten, die mit BD FACSLytic™ erfasst wurden).
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Stellen Sie dann dieselben CD15+ Neutrophile in einem Punktdiagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) gegen CD24 APC dar, setzen Sie entsprechende Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker- CD24-Population, wie in Abbildung 15 gezeigt.

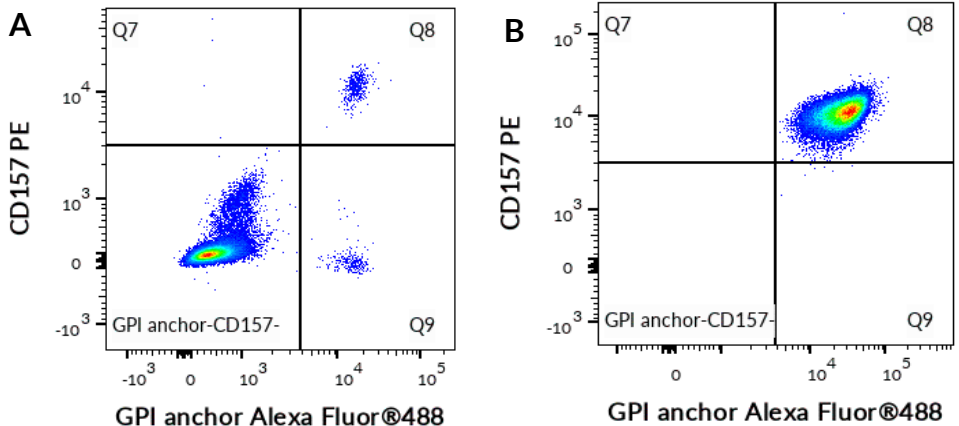
Abbildung 15 CD15+ Neutrophile in einem Punktdiagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 vs. CD24 APC (Daten, die mit BD FACSLytic™ erfasst wurden).
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Stellen Sie dann dieselben CD15+ Neutrophile in einem Punktdiagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) gegen CD157 PE dar, setzen Sie entsprechende Gates und berechnen Sie den Prozentsatz der GPI-Anker-CD157-Population, wie in Abbildung 16 gezeigt.

Abbildung 16 CD15+ Neutrophile in einem Punktdiagramm GPI-Anker Alexa Fluor® 488 vs. CD157 PE (Daten, die mit BD FACSLyric™ erfasst wurden).

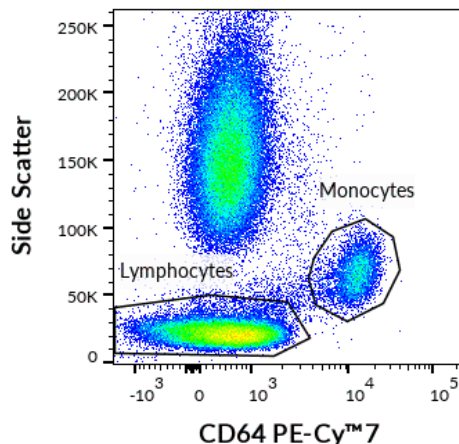
A) Patient mit PNH-Klon; B) gesunder Spender



Interne Kontrolle

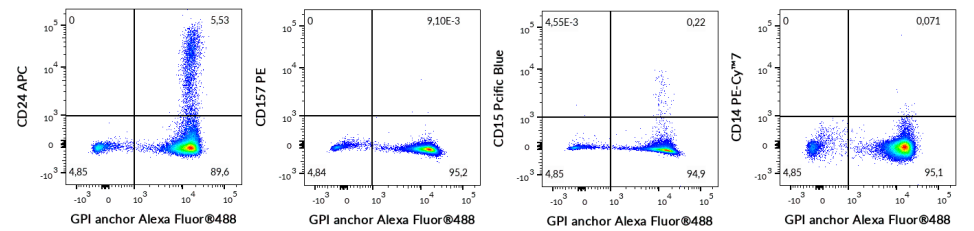
Zur Überprüfung der Spannung und Kompensation des Fluoreszenzdetektors muss die interne Kontrolle überprüft werden (Abbildung 18). Setzen Sie im CD64 PE-Cy™7 vs. Diagramm mit Seitenstreuung ein Gate für Lymphozyten als Population für die interne Kontrolle (Abbildung 17).

Abbildung 17 Abgrenzung von CD64- Lymphozyten von Leukozyten (Daten erfasst auf einem BD FACSLyric™).



Visualisieren Sie anschließend Lymphozyten in Punktdiagrammen mit GPI-Anker Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) vs. CD24 APC/CD157 PE/CD15 Pacific Blue™/CD14 PE-Cy™7 zur Überprüfung der Spannungseinstellungen, Kompensation und Antikörperleistung (Abbildung 18).

Abbildung 18 Interne Kontrollen (Daten erfasst auf dem BD FACSLytic™).



Berechnung und Interpretation von Analyseergebnissen

Zählen Sie den Prozentsatz der Zellen mit GPI-Mangel (mit PNH-Phänotyp) auf, siehe Tabelle 5.

Tabelle 5 PNH-Klon-Phänotypen

Population der Elternzellen		PNH-Phänotyp gemäß der Gating-Strategie
PNH RBC 3-color-Röhrchen	Erythrozyten (Typ III)	CD59- CD235a+ (Abb. 5)
	Erythrozyten (Typ II)	CD59 dim CD235a+ (Abb. 5)
	iRBCS (Typ III)	CD59- CD235a+CD71+ (Abb. 7)
	iRBCS (Typ II)	CD59 dim CD235a+CD71+ (Abb. 7)
PNH WBC 7-color-Röhrchen	Monozyten	CD14- CD157- CD64+ (Abb. 10)
		CD14- GPI-Anker- CD64+ (Abb. 11)
		CD157- GPI-Anker- CD64+ (Abb. 12)
	Neutrophilen	CD24- CD157- CD15+ (Abb. 14)
		CD24- GPI-Anker- CD15+ (Abb. 15)
		CD157- GPI-Anker- CD15+ (Abb. 16)

Tabelle 6 Ergebnisinterpretation

Nachweisgrenze (LOD) für die WBC- und RBC-Röhrchen, angegeben als Häufigkeit der Elternzellen (%), berechnet aus 100 Messungen von n=25 normalen Patientenproben auf n=4 verschiedenen Zytometerplattformen				
PNH-Phänotyp	Zytometer			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
PNH RBC 3-color-Röhrchen				
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	0.005	0.002	0.029	0.049
CD59- iRBCs vom Typ II und Typ III	0.240	0.320	0.388	0.562
PNH WBC 7-color-Röhrchen				
CD157- CD14- Monozyten	0.20	0.19	0.14	0.30
GPI-Anker- CD14- Monozyten	0.08	0.04	0.10	0.17
GPI-Anker- CD157- Monozyten	0.07	0.06	0.04	0.03
CD157- CD24- Neutrophile	0.02	0.02	0.06	0.03
GPI-Anker- CD24- Neutrophile	0.03	0.03	0.02	0.02
GPI-Anker- CD157- Neutrophile	0.01	0.01	0.01	0.01

Algorithmusregeln für die Meldung von GPI-Mängeln ⁽⁶⁾:

1. Einen PNH-Klon im RBC-Röhrchen melden

Zellpopulation	Häufigkeit	Resultierende Aussage und Maßnahme ⁽⁶⁾
CD59- RBC vom Typ II + Typ III	< LOD	„Keine PNH-Zellen nachgewiesen“ Seltene PNH-Phänotyp-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze erfasst
	> 1 %	„PNH-Klon vorhanden“ Zellprozentsatz kann angegeben werden.
	> LOD (Tabelle 6) < 0,01 % ⁽⁶⁾	„PNH-Zellen vorhanden“ Seltene PNH-Phänotyp-Zellen unterhalb der Quantifizierungsgrenze erfasst

2. Einen PNH-Klon im WBC-Röhrchen melden

Zellpopulation	Häufigkeit (%)	Resultierende Aussage und Maßnahme ⁽⁶⁾
GPI-Anker- CD14- Monozyten	< LOD	„Keine PNH-Zellen nachgewiesen“ Seltene PNH-Phänotyp-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze erfasst
	> 1 %	„PNH-Klon vorhanden“ Zellprozentsatz kann angegeben werden.
	> LOD (Tabelle 6); < LLOQ (Tabelle 13, 14)	„PNH-Zellen vorhanden“ Zellprozentsatz kann angegeben werden.
GPI-Anker- CD24- Neutrophile	< LOD	„Keine PNH-Zellen nachgewiesen“ Seltene PNH-Phänotyp-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze erfasst
	> 1 %	„PNH-Klon vorhanden“ Zellprozentsatz kann angegeben werden.
	> LOD (Tabelle 6); < LLOQ (Tabelle 13, 14)	„PNH-Zellen vorhanden“ Zellprozentsatz kann angegeben werden.

3. Geben Sie die PNH-Klongröße in den RBCs an.

Geben Sie die Gesamtgröße des PNH-Klons sowie die Prozentsätze für die PNH-Population vom Typ II und Typ III zusammen mit der gemäß Tabelle 7 ermittelten Zellpopulation an.

4. Geben Sie die PNH-Klongröße in den WBCs an.

Geben Sie die PNH-Klongröße in beiden Zellreihen an – Neutrophile und Monozyten. WBC-PNH-Klone erscheinen geclustert und weniger verstreut als zufällige doppelt negative Ereignisse. Monozyten können größere PNH-Klongrößen aufweisen als Neutrophile ⁽²⁾. Ein GPI-Mangel (Vorhandensein eines PNH-

Klons) sollte bei allen PNH-Phänotypen innerhalb der bestimmten Leukozyten-Untergruppe auftreten. Es wird erwartet, dass alle monozytenspezifischen PNH-Phänotypen (Tabelle 5) eine ähnliche Färbung bei GPI-defizienten Zellen aufweisen ⁽⁶⁾. Dasselbe gilt für neutrophile PNH-Phänotypen.

Terminologie zur Meldung von PNH-Klonen (gemäß CLSI H52-A2):

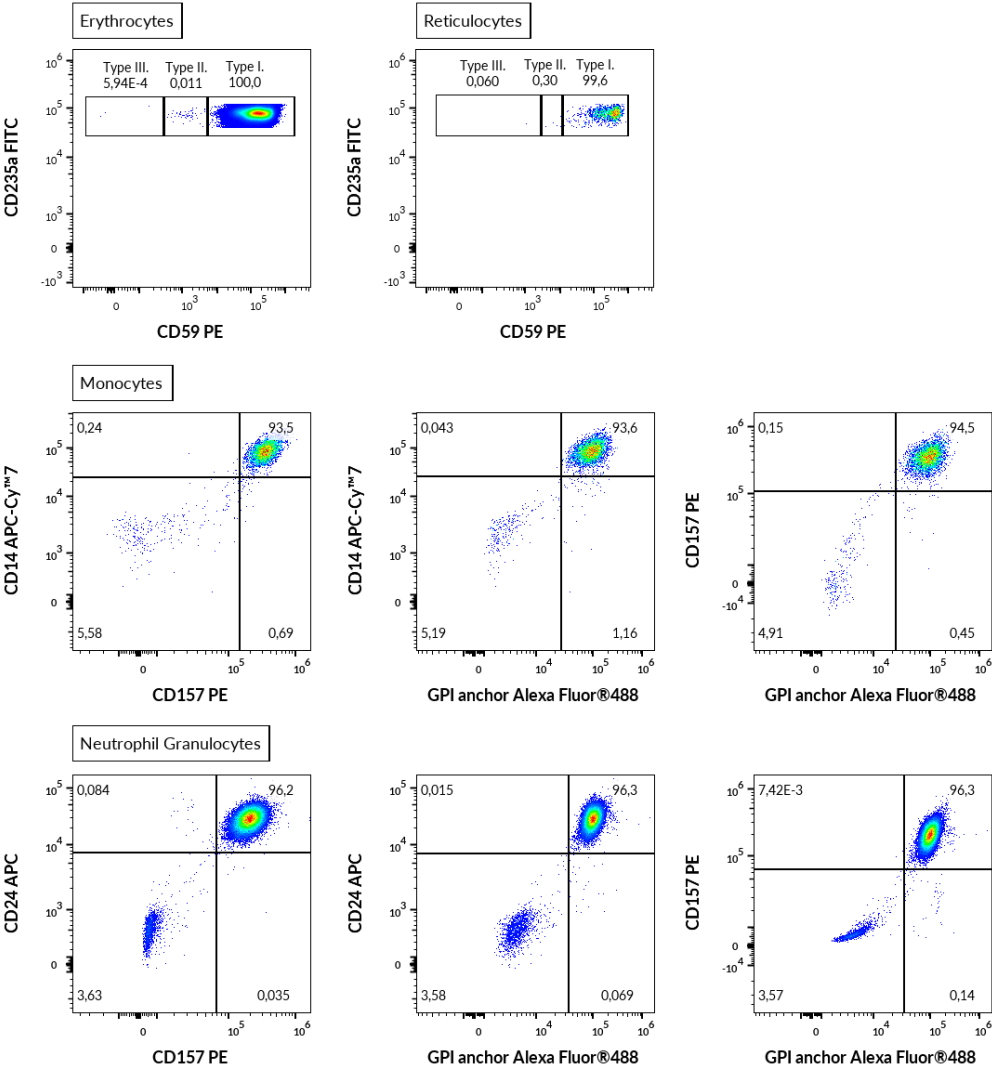
- a. PNH-Population >1 %: „PNH-Klon“
- b. PNH-Population 0,1 % bis 1 %: „kleiner PNH-Klon“
- c. PNH-Population <0,1 %: „seltene Zellen mit PNH-Phänotyp“

Tabelle 7 Beispiele für mögliche Untersuchungsergebnisse (nicht von einem einzelnen Patienten) für ein BD FACLyric™ Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	Anzahl der PNH-Ereignisse	Ereignisanzahl der Elternpopulation	Häufigkeit	LLOQ	Evaluierung
CD59-CD235a+ RBCs	3 Ereignisse	521.023 RBC-Singulett	0.0006 %	0,01 % ⁽⁶⁾	„Keine PNH-Zellen nachgewiesen“ Seltene PNH-Phänotyp-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze erfasst
CD24-GPI-Anker-CD15+	69.851 Ereignisse	75.849 Neutrophile	92,1 %	0,088 % (Tabelle 13)	„PNH-Klon entdeckt“ 92,1 % neutrophile PNH-Klongröße
CD14-GPI-Anker-CD64+	13 Ereignisse	12.497 Monozyten	0,103 %	0,141 % (Tabelle 13)	„PNH-Zellen nachgewiesen; kleiner PNH-Klon“ 0,103 % monozytäre PNH-Klongröße

5. **Histogramme und Punktdiagramme** können optional in den Bericht aufgenommen werden.

Abbildung 19 Beispiel für einen Fall, bei dem ein PNH-Klon in einem WBC-Röhrchen vorhanden ist, während er in einem RBC-Röhrchen nicht nachgewiesen wird (Daten, die mit Beckman Coulter DxFLEx erfasst wurden).



11. Analytische Leistung

Spezifität

Proaerolysin Alexa Fluor® 488 ist eine fluoreszierend markierte Variante des bakteriellen Aerolysins, das sich spezifisch an GPI-Anker von Oberflächenmembranproteinen in menschlichen Zellen bindet ^(1, 2, 5, 8).

Der Antikörper SY11B5 erkennt ein extrazelluläres Epitop auf dem CD157-Antigen des hauptsächlich auf Monozyten und Granulozyten exprimierten CD157-Proteins. Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (Workshop HLDA X).

Der Antikörper 2D1 erkennt alle Leukozyten-Isoformen des menschlichen CD45 (Leukozyten-Common-Antigen). Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (Workshop HLDA III).

Der Antikörper 10.1 erkennt das humane CD64-Antigen, das auf Monozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (Workshop HLDA III: WS Code M-250).

Der Antikörper SN3 reagiert mit dem CD24-Antigen, das von Granulozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (HLDA IV: WS-Code B 136; HLDA V: WS-Code B CD24.7)

Der Antikörper MEM-15 reagiert mit CD14, einem GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-gebundenen Glykoprotein der extrazellulären Membran, das auf Monozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (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 Workshop).

Der Antikörper MEM-158 reagiert mit CD15, das stark auf der Oberfläche von Granulozyten exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde vom HCDM-Rat bestätigt (HLDA VI: WS Code AS A053 Workshop).

Der Antikörper JC159 erkennt ein Epitop des extrazellulären Teils von CD235a (Glycophorin A), einem Sialoglykoprotein, das auf frühen Erythroblasten, späten Erythroblasten, Erythroblasten und reifen Erythrozyten exprimiert wird.

Der Antikörper MEM-43 reagiert mit einem genau definierten Epitop auf CD59 (Protectin), (GPI)-verankertem Glykoprotein, das auf der Oberfläche aller hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (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 Workshop).

Der Antikörper MEM-75 reagiert mit einem extrazellulären Epitop des CD71-Antigens, das auf unreifen iRBCs exprimiert wird. Die Spezifität des Antikörpers wurde von HLDA-Workshops bestätigt (HLDA IV: WS-Code A 45; HLDA V: WS Code T T-165 Workshop).

Genauigkeit

Die Genauigkeit der Methode wurde durch einen Vergleich des DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit mit einer anerkannten internen Methode eines klinischen Labors (ein Cocktail aus einfarbigen konjugierten Antikörpern verschiedener Hersteller, analysiert mit BD FACSCanto™ II) anhand einer parallelen Färbung von 13 Patienten mit bestätigtem Vorliegen des PNH-Phänotyps bewertet. Die Parameter der linearen Regressionsanalyse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 Lineare Regressionsanalyse für relative Zählungen von GPI-defizienten Zellpopulationen bei Patienten mit bestätigter Präsenz von PNH-Phänotypen. Vergleich des DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kits, analysiert mittels BD FACSCanto™ II, mit einer anerkannten internen Methode eines klinischen Labors.

PNH-Phänotyp	n	Steigung	Schnittpunkt	R ²	Bereich [%]
CD59-CD235a+ Typ III Erythrozyten	13	0.99	-0.026	1.00	1.28 – 83.79
CD59-CD235a+ Typ III iRBCs	13	0.99	-0,384	1.00	5.97 – 97.78
CD59-CD235a+ Typ II Erythrozyten	13	1.00	-0,059	1.00	0.13 – 89.92
CD59-CD235a+ Typ II iRBCs	13	0.98	0.141	1.00	0.33 – 74.67
CD157- GPI-Anker- CD64+ Monozyten	13	1.00	0.060	1.00	2.07 – 99.95
CD157- GPI-Anker- CD15- Neutrophile	13	0.99	0.294	1.00	0.80 – 99.82
CD14- GPI-Anker- CD64+ Monozyten	13	Nicht bestimmt			2.04 – 99.96
CD14- CD157- CD64+ Monozyten	13	Nicht bestimmt			2.17 – 99.96
CD24- CD157- CD15+ Neutrophile	13	Nicht bestimmt			0.80 – 99.83
CD24- GPI-Anker- CD15- Neutrophile	13	Nicht bestimmt			0.81 – 99.80

n = Anzahl Blutproben

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD) wurde für jede Zielpopulation (siehe Tabelle 5) als Mittelwert der Ergebnisse von 25 gesunden Blutspendern, erhöht um drei Standardabweichungen vom Mittelwert, für 4 verschiedene Durchflusszytometerplattformen bestimmt (Tabellen 9, 10, 11, and 12).

Tabelle 9 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit LOD-Werte für jeden PNH-Phänotyp, erfasst mit dem BD FACSLytic™ Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	BD FACSLytic™				
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	LOD (Mittelwert + 3*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulettten-RBC-Ereignisse)*					
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0.003	0.001	5–48 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse	0.005 %
CD59- iRBCs vom Typ II und Typ III	25	0.054	0.061	0–5 Ereignisse pro 3.000 iRBCs	0.240 %
WBC-Röhrchen (50.000 Neutrophile und 10.000 Monozyten erfasst)					
CD157- CD14-Monozyten	25	0.076	0.041	2–24 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.20 %
GPI-Anker- CD14-Monozyten	25	0.021	0.018	0–5 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.08 %
GPI-Anker- CD157-Monozyten	25	0.014	0.020	0–4 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.07 %
CD157- CD24-Neutrophile	25	0.006	0.006	0–10 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.02 %
GPI-Anker- CD24-Neutrophile	25	0.006	0.008	0–15 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.03 %
GPI-Anker- CD157-Neutrophile	25	0.002	0.002	0–4 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.01 %

HINWEIS*: Für die Analyse in einem flüssigen Antikörper-Cocktail wird ein Minimum von 98 % Singulettten-Ereignissen empfohlen ⁽²⁴⁾. Ein getrockneter Antikörpercocktail im DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay ermöglicht in der Regel eine geringere Singulettten-Ereignishäufigkeit, sodass eine Singulettten-Ereignishäufigkeit von 98 % möglicherweise nicht erreicht wird.

Tabelle 10 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit LOD-Werte für jeden PNH-Phänotyp, erfasst mit dem BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	BD FACSCanto™ II				
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	LOD (Mittelwert + 3*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulett-RBC-Ereignisse)					
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0.0006	0,0004	1–12 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse	0.002 %
CD59- iRBCs vom Typ II und Typ III	25	0.0657	0.0847	0–5 Ereignisse pro 1.000 iRBCs	0.320 %
WBC-Röhrchen (50.000 Neutrophile und 10.000 Monozyten erfasst)					
CD157- CD14-Monozyten	25	0.085	0.035	2–16 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.19 %
GPI-Anker- CD14-Monozyten	25	0.086	0.096	0–3 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.04 %
GPI-Anker- CD157-Monozyten	25	0.084	0.019	0–7 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.06 %
CD157- CD24-Neutrophile	25	0.004	0.052	0–8 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.02 %
GPI-Anker- CD24-Neutrophile	25	0.006	0.010	0–16 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.03 %
GPI-Anker- CD157-Neutrophile	25	0.002	0.002	0–4 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.01 %

Tabelle 11 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit LOD-Werte für jeden PNH-Phänotyp, erfasst mit dem Beckman Coulter Navios EX Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	Beckman Coulter Navios EX				
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	LOD (Mittelwert + 3*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulett-RBC-Ereignisse)					
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0.007	0.007	4-236 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse	0.029 %
CD59- iRBCs vom Typ II und Typ III	25	0.087	0.100	0-6 Ereignisse pro 1.000 iRBCs	0.388 %
WBC-Röhrchen (50.000 Neutrophile und 10.000 Monozyten erfasst)					
CD157- CD14-Monozyten	25	0.062	0.027	0-23 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.14 %
GPI-Anker- CD14-Monozyten	25	0.024	0.006	0-10 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.10 %
GPI-Anker- CD157-Monozyten	25	0.007	0.011	0-6 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.04 %
CD157- CD24-Neutrophile	25	0.012	0.015	0-21 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.06 %
GPI-Anker- CD24-Neutrophile	25	0.005	0.005	0-6 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.02 %
GPI-Anker- CD157-Neutrophile	25	0.002	0.002	0-5 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.01 %

Tabelle 12 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit LOD-Werte für jeden PNH-Phänotyp, erfasst mit dem Beckman Coulter DxFLEx Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	Beckman Coulter DxFLEx				
	n	Durchschnitt [%]	SD [%]	Inzidenz des PNH-Phänotyps	LOD (Mittelwert + 3*SD)
RBC-Röhrchen (1.000.000 erfasste Ereignisse; min. 80 % Singulett-RBC-Ereignisse)					
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	25	0,015	0.012	5–48 Ereignisse pro 1.000.000 Ereignisse	0.049 %
CD59- iRBCs vom Typ II und Typ III	25	0.106	0.152	0–5 Ereignisse pro 1.000 iRBCs	0.562 %
WBC-Röhrchen (50.000 Neutrophile und 10.000 Monozyten erfasst)					
CD157- CD14-Monozyten	25	0.092	0.068	0–27 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.30 %
GPI-Anker- CD14-Monozyten	25	0.053	0.040	0–16 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.17 %
GPI-Anker- CD157-Monozyten	25	0.005	0.009	0–1 Ereignisse pro 10.000 Monozyten	0.03 %
CD157- CD24-Neutrophile	25	0.010	0.008	0–14 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.03 %
GPI-Anker- CD24-Neutrophile	25	0.008	0.006	0–10 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.02 %
GPI-Anker- CD157-Neutrophile	25	0.002	0.002	0–3 Ereignisse pro 50.000 Neutrophile	0.01 %

Bestimmungsgrenze

Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde durch serielle Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) einer frischen PNH-Probe mit einer frischen normalen Blutprobe bestimmt und durch dreifache Färbung und Analyse mit BD FACSLyric™ und Beckman Coulter DxFlex bewertet. Als Empfindlichkeitskriterium für die LLOQ wurde ein maximaler CV von 10 % gewählt.

Tabelle 13 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Häufigkeitswerte von LLOQ, erfasst mit dem BD FACSLyric™ Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	Verdünnung	Anzahl der PNH-Zellen	LLOQ	CV
CD59- RBC vom Typ II und Typ III	1:10,000	101	0.029 %	3.9 %
CD157- CD14- Monozyten	1:10,000	28	0.677 %	2.3 %
GPI-Anker- CD14- Monozyten	1:10,000	7	0.130 %	7.7 %
GPI-Anker- CD157- Monozyten	1:10,000	2	0.018 %	9.9 %
CD157- CD24- Neutrophile	1:10,000	3	0.012 %	3.6 %
GPI-Anker- CD24- Neutrophile	1:10,000	1	0.009 %	8.7 %
GPI-Anker- CD157- Neutrophile	1:10,000	1	0.010 %	1.2 %

Tabelle 14 DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit Häufigkeitswerte von LLOQ, erfasst mit dem Beckman Coulter DxFLEX Durchflusszytometer.

PNH-Phänotyp	Verdünnung	Anzahl der PNH-Zellen	LLOQ	CV
CD59- Typ II und Typ III RBCs	1:10,000	101	0.005 %	9.1 %
CD157- CD14- Monozyten	1:10,000	22	0.143 %	4.0 %
GPI-Anker- CD14- Monozyten	1:10,000	4	0.026 %	2.2 %
GPI-Anker- CD157- Monozyten	1:10,000	11	0.068 %	5.9 %
CD157- CD24- Neutrophile	1:10,000	29	0.024 %	4.2 %
GPI-Anker- CD24- Neutrophile	1:10,000	8	0.007 %	7.1 %
GPI-Anker- CD157- Neutrophile	1:10,000	9	0.007 %	8.5 %

HINWEIS: Für die Durchflusszytometrieanalyse wurden folgende Durchflusszytometer inklusive Softwareversion verwendet:
 BD FACSCanto™ II BD FACSDiva Software – Version 8.0.2
 BD FACSLytic™ BD FACSuite™ Software – Version v1.5.0.925
 Beckman Coulter DxFLEX CytExpert for DxFLEX – Version 2.0.2.18
 Beckman Coulter Navios EX Navios EX Software – Version 2.2

Zur Auswertung der Messdaten wurde folgende Analyseplattform verwendet:
 FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - version 10.9.0

12.Klinische Leistung

Patienten mit GPI-Mangel

Klinische Daten wurden an einem klinischen Standort von 19 Patienten gesammelt, sowohl von gesunden Patienten ⁽⁶⁾ als auch von Patienten mit bestätigtem GPI-Mangel ⁽¹³⁾. Die klinische Leistung wurde durch einen Vergleich des DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kits mit einer internen Methode eines anerkannten klinischen Labors ermittelt (ein Cocktail aus einfarbig konjugierten Antikörpern verschiedener Hersteller und analysiert mit BD FACSCanto™ II). Der GPI-Mangel bei Patienten wurde im Hinblick auf die verwendete Methode (Tabelle 15) durch den Nachweis von GPI-defizienten Zellen (PNH-Klonen) bewertet.

Tabelle 15 Klinische Leistung des Produkts DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Beurteilung des GPI-Mangels mit der internen Methode eines akkreditierten klinischen Labors	
		GPI-Mangel	Normalzustand
Beurteilung des GPI-Mangels mit dem Gerät DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	GPI-Mangel	13 Patienten	0 Patienten
	Normalzustand	0 Patienten	6 Patienten

13. Erwartete Werte

In der Normalbevölkerung wird kein GPI-Mangel festgestellt, und es wird erwartet, dass alle Prozentwerte des PNH-Phänotyps unter dem Assay Cut-off des Tests (LOD) liegen ⁽⁶⁾.

14. Einschränkungen

Es wurden keine Einschränkungen für die Anwendung bei bestimmten Arten von Krankheiten, wie z. B. Anämien, festgestellt.

Die Meldung von GPI-Mängeln ist gemäß den aktuellen, veröffentlichten Leitlinien ⁽⁶⁾ begrenzt.

Der PNH-Klon wird in Lymphozyten nicht nachgewiesen, da er häufiger in Neutrophilen und Monozyten als in reifen Lymphozyten vorkommt. Dies deutet darauf hin, dass lymphatische Zellen langlebig sind und möglicherweise bereits vor der Bildung oder Expansion von PNH-Klonen existieren.

15. Referenzen

- 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.Kurzbericht über Sicherheit und Leistung

Der Kurzbericht über Sicherheit und Leistung wird in der Eudamed-Datenbank unter <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home> verfügbar sein. Bis dahin ist der Kurzbericht über Sicherheit und Leistung auf Anfrage erhältlich.

17.Verwendung von Marken Dritter

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™ und FlowJo™ sind eingetragene Marken von Becton, Dickinson and Company. Cy™ ist eine eingetragene Marke von Cytiva. VenturiOne® ist eine eingetragene Marke von Applied Cytometry. Infinicyt™ ist eine eingetragene Marke von Cytognos S.L.. SPHERO™ COMPTrol ist eine eingetragene Marke von Spherotech, Inc.

18.Revisionsverlauf

Version 4, ED7750_IFU_v4

- 1) Kapitel „Probe“ wurde aktualisiert.
- 2) Vorsichtshinweise in Kapitel 10 wurden aktualisiert.
- 3) Die Abschnitte „PNH RBC 3-color-Röhrchen“ und „PNH WBC 7-color-Röhrchen“, einschließlich der Abbildungen in Kapitel 10, wurden aktualisiert.
- 4) Der Abschnitt „Interne Kontrollen“ in Kapitel 10 wurde hinzugefügt.

- 5) Ein Vorsichtshinweis im Abschnitt „Berechnung und Interpretation von Analyseergebnissen“ wurde hinzugefügt.
- 6) Der Abschnitt „Algorithmusregeln für die Meldung von GPI-Mängeln“ wurde aktualisiert.
- 7) Abschnitt 11 „Analytische Leistung“ wurde aktualisiert.
- 8) Der Abschnitt „Einschränkungen“ wurde aktualisiert
- 9) Die Nummerierung der Artikel im Abschnitt „Referenzen“ wurde korrigiert.

19.Hersteller

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

Kontaktinformationen

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

20.Autorisierte Vertreter

Verantwortliche Person der Schweiz	EUMEDIQ AG Grafenauweg 8 CH-6300 Zug Switzerland www.eumediq.eu
------------------------------------	---

HINWEIS: Alle schwerwiegenden Vorfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde vor Ort zu melden.