

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

25 testů | Kat. č. ED7750

IVD **CE**₂₂₆₅

Návod k použití (CS)

Verze: ED7750_IFU_v4_CS

Datum vydání: 13-03-2026

Symboły použité k označení prostředku

IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Omezení teploty
CE ₂₂₆₅	Označení shody CE ID číslo notifikované osoby		Chránit před slunečním zářením
	Výrobce		Chránit před vlhkem
UDI	Jedinečná identifikace prostředku (UDI)		Pozor
	Čtěte návod k použití		Nepoužívat opakovaně
	Obsah postačuje pro <n> testů	TUBE	Obsahuje <n> zkumavek na jedno použití
REF	Katalogové číslo	CONC 10x	Koncentrovaný roztok (10x)
LOT	Kód dávky	CONTENTS	Obsah
	Použit do data	UK CA	Označení shody UKCA

1. Určený účel prostředku

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit detekuje a počítá buňky s glykosyl-fosfatidyl-inositolovým (GPI) deficitem z plné lidské krve pomocí průtokové cytometrie.

Co se zjišťuje a/nebo měří

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit detekuje a měří buňky s glykosyl-fosfatidyl-inositolovým (GPI) deficitem (PNH klony) jako procentuální zastoupení:

- CD59 dim nebo CD59- buněk ze všech erytrocytů (CD235a+)
- CD59 dim nebo CD59- buněk ze všech iRBC (CD235a+CD71+)
- CD14-, CD157- a GPI kotva- buněk ze všech monocytů (CD45+CD64+)
- CD24-, CD157- a GPI kotva- buněk ze všech neutrofilů (CD45+CD15+)

Funkce prostředku

Prostředek je určen ke stanovení diagnózy a monitorování pacientů trpících, nebo s podezřením na paroxysmální noční hemoglobinurii (PNH) a související poruchy ⁽¹⁾.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) je vzácná porucha hematopoetických kmenových buněk, která je důsledkem nezhoubné klonální expanze buněk se somatickou mutací genu pro biosyntézu glykosylfosfatidylinositolu A (PIG-A). Mutace v genu PIG-A vede k neschopnosti exprimovat glykosyl-fosfatidyl-inositol (GPI)-kotvené povrchové proteiny.

Prostředek je určen k detekci GPI-deficitních neutrofilů a monocytů ⁽¹⁾ spolu s kompletně (Typ III) a částečně (Typ II) GPI-deficitními erytrocyty ^(2,3,4,5,6) pro hodnocení velikosti PNH klonu.

Kromě toho prostředek detekuje GPI-deficitní iRBC (nezralé erytrocyty) u pacientů, kteří dostávají krevní transfuze, kdy je obtížné definovat PNH erytrocyty ⁽⁷⁾.

Typ testu

Není automatizovaný

Kvantitativní

Typ požadovaného vzorku

Vzorek lidské antikoagulované periferní plné krve (EDTA, heparin, citrát) ⁽¹⁾

Testovací populace

Pacienti s:

- laboratorními markery hemolýzy, pokud byly vyloučeny jiné častější příčiny hemolýzy,
- nevysvětlitelnými trombózami v mladém věku,

- diagnostikovanými trombózami na neobvyklém místě,
- dědičnou nebo získanou aplastickou anémií (AA),
- myelodysplastickým syndromem (MDS),
- nevysvětlitelnou cytopenií, u níž jsou AA nebo MDS diferenciálně diagnostickými úvahami ⁽¹⁾

2. Účel použití

Prostředek je určen pouze pro profesionální použití v laboratoři. Prostředek není určen pro vyšetření v blízkosti pacienta nebo přímo u pacienta a není určen pro sebetestování.

Požadavky na kvalifikaci

Uživatel musí mít současné odborné znalosti v oblasti průtokové cytometrie, ovládat standardní laboratorní techniky, včetně pipetování, manipulovat bezpečně a správně se vzorky z lidského těla.

Uživatel musí splňovat normu EN ISO 15189, případně jiné národní legislativní normy.

3. Princip testu

Princip testu je založen na detekci GPI kotvy a GPI-ukotvených proteinů na povrchu lidských krevních buněk. Monoklonální protilátky a rekombinantní proaerolysin použité v testu jsou značené různými fluorochromy, které jsou excitovány laserovým paprskem z průtokového cytometru během akvizice zpracovaného krevního vzorku. Fluorescence (emise světla) zachycená z každého fluorochromu na naznačené krevní buňce je následně sbírána a analyzována cytometrem. Intenzita fluorescence je přímo úměrná hustotě exprese antigenu v detekované buňce, což umožňuje rozlišení různých buněčných subpopulací.

4. Poskytované materiály

Obsah

Prostředek DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, který vystačí k vyšetření 25 pacientů, je dodáván ve formátu:

PNH High-Sensitivity Assay (25 sáčků). Každý sáček se skládá z jednobarevné (modrý proužek) uzavřené zkušavky na jedno použití **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) a jednobarevné (červený proužek) uzavřené zkušavky na jedno použití **PNH RBC 3-color** (ED7750-2), obsahující kombinaci sušených fluorescenčně značených reagentů se stabilizačními složkami na dně testovacích zkušavek (12 x 75 mm), viz tabulka 1 a 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 láhev) obsahující 15 ml koncentrovaného (10X) roztoku na bázi formaldehydu.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 sáček) obsahující 10 uzavřených zkumavek na jedno použití, z nichž každá obsahuje sušenou fluorescenčně značenou reagensii se stabilizačními složkami na dně testovací zkumavky (12 x 75 mm).

UPOZORNĚNÍ: PNH Kompenzační set je určen pouze k nastavení kompenzace. Jednotlivé fluorescenčně značené reagensie (tabulka 1 a 2) umožňují snadný a přesný postup kompenzace.

Složení

Tabulka 1 Popis aktivních složek PNH WBC 7-color

Antigen	Fluorochrom	Klon	Izotyp
GPI kotva (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

Tabulka 2 Popis aktivních složek PNH RBC 3-color

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

5. Nutné, ale neposkytované materiály

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr (1X PBS), pH 7,2 – 7,4

Kompenzační částice pro průtokovou cytometrii (Spherotech SPHERO™ COMPtrol Kit, Kat. č. CMIgP-50-3K nebo podobné kompenzační částice)

6. Nutná zařízení

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (100 µl – 5 ml) pro pipetování vzorků a činidel

Dávkovač kapalin nebo pipeta s jednorázovými špičkami (2 ml) pro dávkování lyzačního roztoku

Vortex

Kónické polypropylenové centrifugační zkumavky (15 ml nebo 50 ml) pro přípravu vzorků

Centrifuga s příslušnými adaptéry rotoru na zkumavky s kulatým dnem 12 x 75 mm

Průtokový cytometr vybavený třemi laserovými excitačními zdroji (488 nm, ~635 nm a 405 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů z fluorochromů uvedených v tabulce 3

Tabulka 3 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v prostředí

Fluorochrom	Excitace [nm]	Emise [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

POZNÁMKA: Prostředek byl testován na průtokových cytometrech BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 20-30 °C.

Vyhňte se dlouhodobé expozici na světlo.

Udržujte v suchu.

UPOZORNĚNÍ: Produkt citlivý na vlhkost. Fóliový sáček otevírejte bezprostředně před prvním použitím.

Informace o stabilitě po prvním otevření a době použitelnosti po prvním otevření, spolu s podmínkami skladování a stabilitou pracovních roztoků (v případě potřeby) naleznete v části 10 Postup (Příprava reagentů).

8. Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VAROVÁNÍ: Lysing Solution (ED7750-3) obsahuje formaldehyd (CAS č. 50-00-0) a metanol (CAS č. 67-56-1) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Nebezpečí
	
H-věty	H302: Zdraví škodlivý při požití. H315: Dráždí kůži. H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. H319: Způsobuje vážné podráždění očí. H331: Toxický při vdechování. H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest. H341: Podezření na genetické poškození. H350: Může vyvolat rakovinu. H371: Může způsobit poškození orgánů. H373: Může způsobit poškození ledvin při prodloužené nebo opakované expozici při požití. EUH071: Způsobuje poleptání dýchacích cest.
P-věty	P201: Před použitím si obstarejte speciální instrukce. P260: Nevdechujte páry. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. P308+P313: PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P403+P233: Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte obal těsně uzavřený.

Úplné informace o rizicích, která představují chemické látky a směsi obsažené v tomto výrobku a o tom, jak s nimi zacházet a jak je likvidovat, naleznete v Bezpečnostním listu (SDS), který je k dispozici na www.exbio.cz.

Biologické riziko

Lidské biologické vzorky, krevní vzorky a jakékoliv materiály, které s nimi přicházejí do kontaktu, jsou vždy považovány za infekční.

Používejte osobní ochranné a bezpečnostní pomůcky, abyste zabránili kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.

Dodržujte všechny platné zákony, předpisy a postupy pro manipulaci a likvidaci infekčních materiálů.

Projevy znehodnocení prostředí

Normální vzhled dodané reagentie je průhledná vysušená vrstva na dně zkušavky. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. přítomnost vlhkosti uvnitř zkušavky.

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

Nepoužívejte zkušavky opakovaně.

9. Vzorek

Použijte žilní periferní krev odebranou do zkušavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem EDTA, heparin nebo ACD (Acid Citrate Dextrose) ⁽¹⁾.

Používejte pouze čerstvý a nepřepřacovaný vzorek. Nepoužívejte předem lyzovaný, promytý nebo zředěný vzorek.

Vzorek krve zpracujte nejpozději do 48 hodin po odběru. Pokud bude vzorek zpracován do 24 hodin, uchovávejte jej při laboratorní teplotě (20–25 °C). Pokud je zpracování odloženo na více než 24 hodin, ale do 48 hodin, uchovávejte vzorek v chladničce ⁽¹⁾.

Endogenní interference

Na základě výzkumu vědecké literatury jsou zdroje endogenní interference identifikovány v tabulce 4.

Tabulka 4 Endogenní interference prostředku

Endogenní interference	Vliv	Odkazy
Albumin	Albumin může interferovat ve vysokých koncentracích díky své schopnosti vázat a také uvolňovat velká množství ligandů.	9, 10, 11
Bilirubin (žloutenka) (nekonjugovaný)	Bilirubin může zvýšit fluorescenční pozadí buněk díky své vysoké autofluorescenci.	12, 13, 14

Zbytky buněk (po lýze)	Zbytky buněk mohou poskytovat nepřesné počty buněk a vyčerpat protilátky v zařízení.	15, 16
Erytrocyty	Nedostatečná lýza, červené krvinky přítomné ve vzorku mohou vést k chybnému počítání buněk.	17
Hemoglobin	Hemolyzované vzorky mohou poskytovat chybné výsledky.	18
Lidské anti-myší protilátky	Může ovlivnit funkčnost prostředku (schopnost vázat se na antigeny buněčného povrchu).	19
Imunoglobuliny	Může ovlivnit počet podskupin lymfocytů.	12
Revmatoidní faktory	Přítomnost RF interferuje s MIA (multiplexní imunoanalýzy).	20
Triglyceridy	Vysoké cirkulující hladiny lipidů mohou ovlivnit analýzu průtokovou cytometrií určitých populací krevních buněk.	21

Exogenní interference

Podle publikovaných článků Sutherland et. al.⁽⁷⁾ jsou červené krvinky z krevních transfuzí hlavním rušivým faktorem při analýze PNH u pacientů s velkým klonem PNH, u nichž dochází k extravaskulární hemolýze. Zdravé erytrocyty přijaté transfuzí významně ovlivňují sledování PNH klonu v červené krevní řadě (RBC). Přidání CD71 významně zlepšuje schopnost analyzovat velikost PNH klonu v linii RBC bez ohledu na hemolytický a/nebo transfuzní stav pacienta.

Prostředek DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit překonává tento problém podle dříve uvedených doporučení tím, že nabízí antigen CD71 pro identifikaci nezralých červenýchrvinek (iRBC), kde iRBC rovněž exprimují antigen CD59 ukotvený v GPI. V transfuzních vacích jsou iRBC obvykle zastoupeny ve velmi malém množství⁽²²⁾. Na druhou stranu pacienti, u nichž dochází k extravaskulární hemolýze způsobené PNH, mají zvýšený počet iRBC v důsledku rychlých ztrát erytrocytů⁽²³⁾. Přidáním monoklonální protilátky CD71 k identifikaci iRBC má tedy lékař k dispozici přesnější sledování průběhu PNH, které je hlášeno jako ztráta antigenu CD59 na iRBC, a překonává tak interferenci exogenních RBC z transfuzních vaků. DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit obsahuje protilátku proti lidskému CD71 a umožňuje použití nejnovějších doporučení pro detekci a kvantifikaci klonu PNH.

10. Postup

Příprava reagensí

PNH High-Sensitivity Assay

Není nutná žádná příprava reagensie. Reagensie se dodává ve zkumavkách na jedno použití.

Lyzační roztok

Před použitím vytemperujte činidlo na pokojovou teplotu.

Naředte 10X koncentrovaný lyzační roztok na pracovní roztok deionizovanou vodou (1 objem koncentrovaného roztoku a 9 objemů deionizované vody). Po prvním otevření si činidlo zachovává své funkční charakteristiky až do data expirace, pokud je skladováno za uvedených podmínek v původní primární nádobě.

Naředěný lyzační roztok (1X) je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud je skladován v dávkovači kapalin nebo uzavřené nádobě při laboratorní teplotě.

Příprava nutných, ale neposkytovaných materiálů

Kompenzační částice

Podle pokynů výrobce připravte pracovní roztok kompenzačních částic na průtokový cytometr.

Nastavení kompenzace

Změřte zkumavky PNH Compensation Set pomocí stejného nastavení průtokového cytometru jako v případě obarvených zkumavek PNH RBC 3-color a PNH WBC 7-color.

UPOZORNĚNÍ: Postup nastavení kompenzace pomocí PNH RBC 3-color a PNH WBC 7-color se liší typem přípravy vzorku a barvením vzorku.

PNH RBC 3-color kompenzační zkumavky (červený proužek)

1. Přidejte **SPHERO™ COMPtrol Kit** nebo ekvivalentní kompenzační částice na dno každé jednobarevné kompenzační zkumavky.
2. Vortexujte a následně inkubujte po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
3. Přidejte 4 ml 1X PBS do každé kompenzační zkumavky. Centrifugujte 5 minut při 300×g.
4. Odstraňte supernatant bez narušení kompenzačních částic a přidejte 0,1 ml 1X PBS do každé kompenzační zkumavky.
5. Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno

dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.

6. Obarvené kompenzační zkušavky ihned měřte průtokovým cytometrem.
7. Vypočítejte kompenzační matici PNH RBC 3-color buď v softwaru vyvinutém výrobcem cytometru nebo v softwaru určeném pro offline analýzu cytometrických dat. Tuto kompenzační matici použijte pro všechny zkušavky této šarže PNH RBC 3-color

UPOZORNĚNÍ: Po nastavení pro konkrétní šarži PNH RBC 3-color neměňte nastavení fluorescenčních detektorů, abyste zachovali stejné nastavení kompenzační matice a výsledky kompenzace.

PNH WBC 7-color kompenzační zkušavky (modrý proužek)

1. Přidejte 50 µl deionizované vody na dno každé jednobarevné kompenzační zkušavky a intenzivně vortexujte po dobu 7 – 10 sekund.
2. Přidejte **100 µl periferní plné krve do každé jednobarevné kompenzační zkušavky** a intenzivně vortexujte.
3. Inkubujte po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
4. Přidejte 2 ml pracovního roztoku lyzačního činidla (1X) do každé kompenzační zkušavky.
5. Inkubujte po dobu 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
6. Centrifugujte po dobu 5 minut při 300×g, odstraňte supernatant a resuspendujte buněčný pelet ve 2 ml 1X PBS.
7. Centrifugujte po dobu 5 minut při 300×g, odstraňte supernatant a resuspendujte buněčný pelet v 0,2 ml 1X PBS.
8. Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.
9. Obarvené kompenzační zkušavky ihned měřte průtokovým cytometrem.
10. Vypočítejte kompenzační matici PNH WBC 7-color buď v softwaru vyvinutém výrobcem cytometru nebo v softwaru určeném pro offline analýzu cytometrických dat. Tuto kompenzační matici použijte pro všechny zkušavky této šarže PNH WBC 7-color.

UPOZORNĚNÍ: Po nastavení pro konkrétní šarži PNH WBC 7-color neměňte nastavení fluorescenčních detektorů, abyste zachovali stejné nastavení kompenzační matice a výsledky kompenzace.

Příprava vzorku

Detekce a odlišení PNH klonů v erytrocytech pomocí PNH RBC 3-color zkumavek vyžaduje přípravu vzorku před barvením.

POZNÁMKA: Před zpracováním vzorku se ujistěte, že je cytometr správně nastaven.

1. Označte polypropylenovou kónickou zkumavku identifikačním údajem vzorku.
2. Pipetujte 10 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno označené kónické zkumavky.
3. Naředěte krevní vzorek v poměru 1:100 pomocí 1 ml 1X PBS a promíchejte po dobu 5 sekund ručním kýváním.

UPOZORNĚNÍ: V klasické formě PNH dominuje intravaskulární hemolýza. Před ředěním krevního vzorku se podívejte na počty červených krvinek z hematologického analyzátoru, abyste dosáhli počtu červených krvinek ve zředěném krevním vzorku v rozmezí $3 - 5 \times 10^7$ / ml naředěné krve a upravte faktor ředění podle potřeby, abyste získali dostatečný počet červených krvinek z průtokového cytometru.

4. Po naředění vzorku ihned přejděte k barvení vzorku.

Detekce buněk s GPI deficitem v neutrofilech a monocytech pomocí PNH WBC 7-color zkumavek nevyžaduje žádnou přípravu vzorku před barvením.

Značení vzorku – PNH RBC 3-color zkumavka (červený proužek)

1. Označte PNH RBC 3-color zkumavku identifikačním údajem vzorku.
2. Pipetujte **50 µl dobře promíchaného naředěného krevního vzorku** na dno PNH RBC 3-color zkumavky.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud stopy nebo kapky krve ulpí na stěně zkumavky, nemusí být obarveny reagensy a výsledky testu nemusí být platné.

3. Intenzivně vortexujte po dobu 7-10 sekund.

UPOZORNĚNÍ: Zkrácení doby vortexování může ovlivnit výsledky testu.

4. Inkubujte zkumavku PNH RBC 3-color po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
5. Přidejte 4 ml 1X PBS do zkumavky PNH RBC 3-color.

6. Centrifugujte zkumavku PNH RBC 3-color 5 minut při 300×g.
7. Odstraňte supernatant bez narušení buněčné pelety a přidejte 0,5 ml 1X PBS do PNH RBC 3-color zkumavky.
8. Krátce vortexujte, aby se buněčná peleta resuspendovala.

Obarvený vzorek ihned měřte průtokovým cytometrem. V případě, že obarvený vzorek nebude okamžitě změřen, uzavřete zkumavku víčkem, uchovávejte v temnu při 2-8 °C a analyzujte do 2 hodin.

UPOZORNĚNÍ: Před měřením na průtokovém cytometru narušte buněčné agregáty v obarveném vzorku tak, že pevně uchopíte zkumavku a přejíždíte 6-10krát dnem zkumavky po vrchní straně stojanu na vzorky. Nadměrné množství RBC agregátů může ovlivnit výsledky testu.

Značení vzorku – PNH WBC 7-color zkumavka (modrý proužek)

1. Označte PNH WBC 7-color zkumavku identifikačním údajem vzorku.
2. Přidejte **50 µl deionizované vody** do zkumavky PNH WBC 7-color. Intenzivně vortexujte po dobu 7-10 sekund.

UPOZORNĚNÍ: Zkrácení doby vortexování může ovlivnit výsledky testu.

3. Pipetujte **100 µl dobře promíchaného krevního vzorku** na dno zkumavky PNH WBC 7-color a intenzivně vortexujte.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud stopy nebo kapky krve ulpí na stěně zkumavky, nemusí být obarveny reagensy a výsledky testu nemusí být platné.

4. Inkubujte po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
5. Přidejte 2 ml pracovního roztoku lyzačního činidla (1X) do PNH WBC 7-color zkumavky.
6. Inkubujte po dobu 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
7. Centrifugujte zkumavku PNH WBC 7-color 5 minut při 300×g.
8. Odstraňte supernatant bez narušení buněčné pelety a přidejte 2 ml 1X PBS do testovací zkumavky.
9. Centrifugujte zkumavku PNH WBC 7-color 5 minut při 300×g.
10. Odstraňte supernatant bez narušení buněčné pelety a přidejte 0,2 ml 1X PBS do testovací zkumavky.
11. Krátce vortexujte, aby se buněčná peleta resuspendovala.

Obarvený vzorek ihned měřte průtokovým cytometrem. V případě, že obarvený vzorek nebude okamžitě změřen, uzavřete zkumavku víčkem, uchovávejte v temnu při 2-8 °C a analyzujte do 24 hodin.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s prostředkem DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit musí být rutinně kalibrován pomocí fluorescenčních mikrokuliček podle pokynů výrobce cytometru, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

Při nesprávné údržbě může průtokový cytometr poskytovat falešné výsledky.

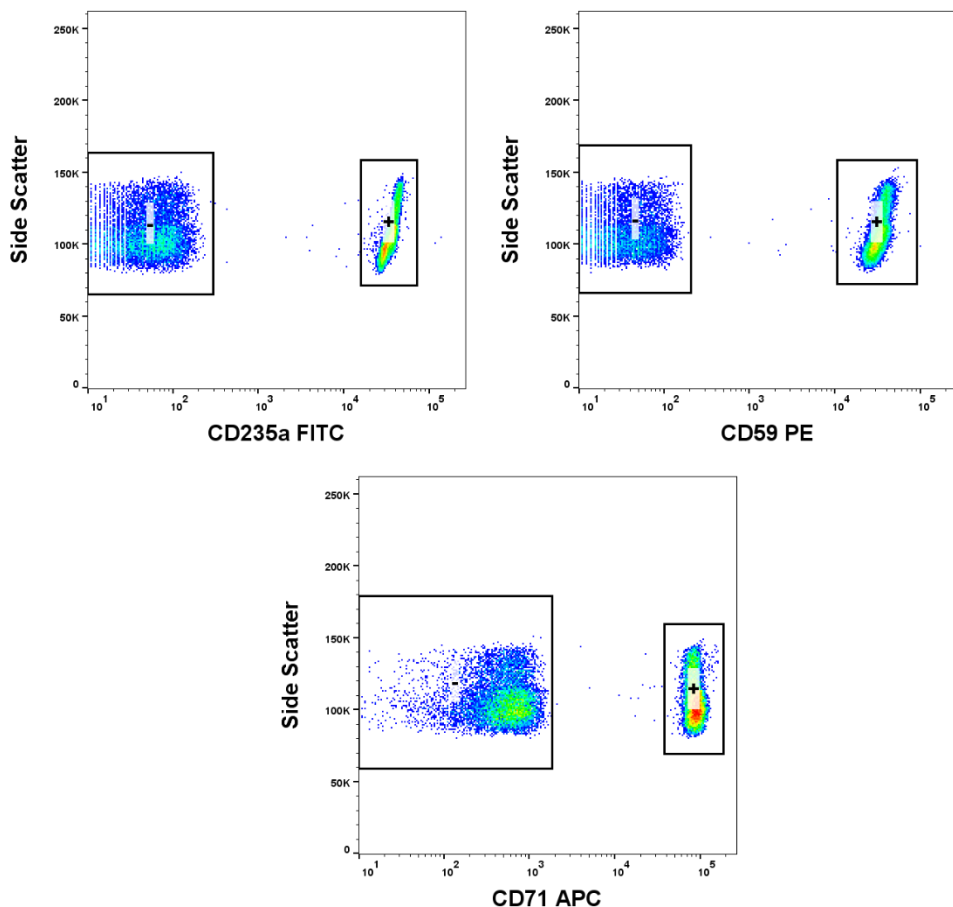
V sekci 6 Nutná zařízení jsou uvedeny potřebné specifikace cytometru pro lasery a fluorescenční detektory podle excitačních a emisních charakteristik fluorochromů.

Pro analýzu naměřených dat je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analýza PNH RBC 3-color kompenzačních zkumavek (červený proužek)

Zobrazte nekompensovaná data pro každou kompenzační zkumavku v grafu side-scatter (SSC) versus „fluorochrom, který má být kompenzován“. Nastavte regiony (gaty) pro pozitivní (+) a negativní (-) kompenzační částice, jak je znázorněno na obrázku 1.

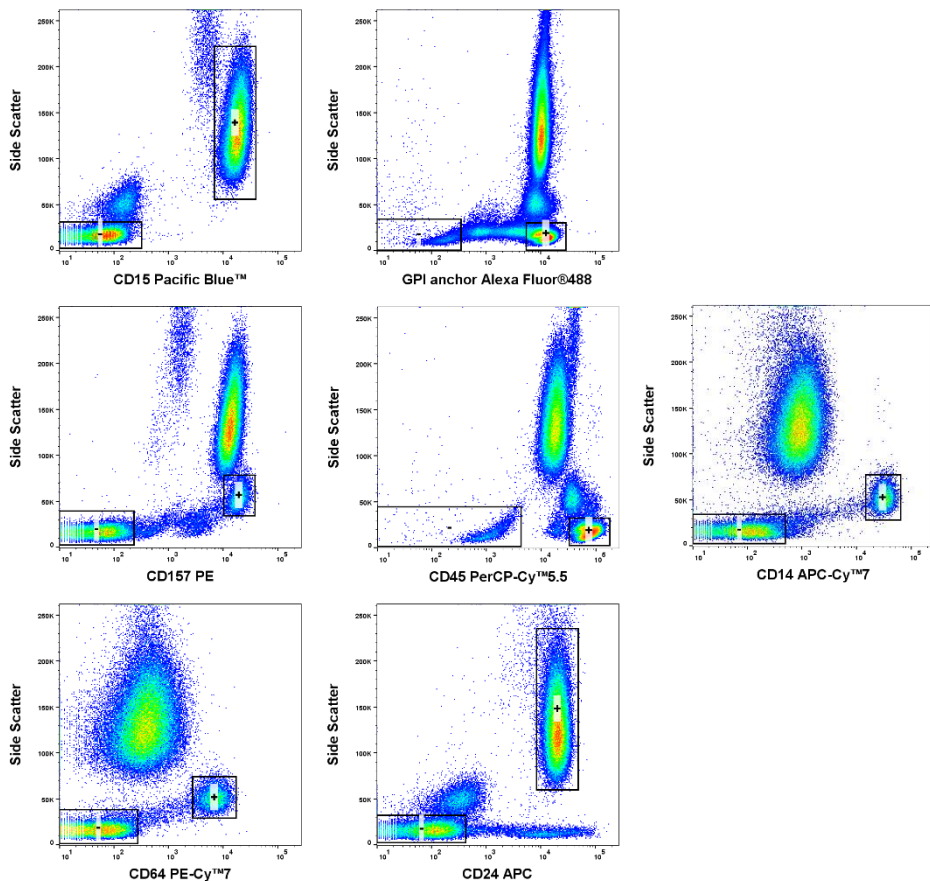
Obrázek 1 Identifikace pozitivních (+) a negativních (-) kompenzačních částic v kompenzačních zkumavkách (data získaná na BD FACSCanto™ II).



Analýza PNH WBC 7-color kompenzačních zkušavek (modrý proužek)

Zobrazte nekompenzovaná data pro každou kompenzační zkušavku v grafu sice-scatter (SSC) versus „fluorochrom, který má být kompenzován“. Nastavte regiony (gaty) pro nejvíce pozitivní (+) a nejvíce negativní (-) populace, jak je znázorněno na obrázku 2.

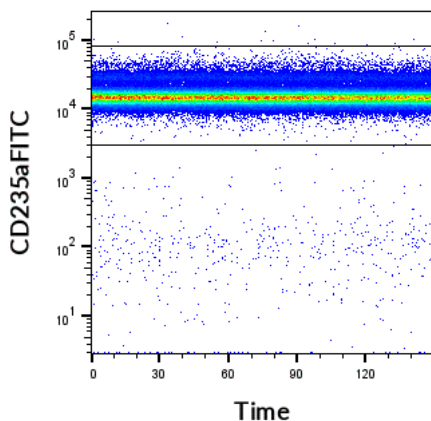
Obrázek 2 Identifikace nejvíce pozitivních (+) a nejvíce negativních (-) událostí v kompenzačních zkušavkách (data získaná na BD FACSCanto™ II).



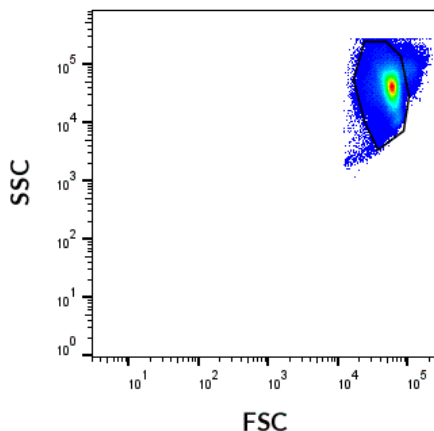
PNH RBC 3-color zkumavka (červený proužek)

Vzhledem k nízkému iRBC ve zředěném krevním vzorku, zajistěte pro analýzu minimálně 500 000 událostí erytrocytů. Zaznamenání $\geq 500\,000$ událostí trvá delší dobu. Může to ovlivnit rovnováhu vazebného komplexu protilátka-antigen a snížení fluorescence CD235a FITC. Vždy sledujte stabilitu intenzity fluorescence po dobu akvizice (obrázek 3).

Obrázek 3 Zkontrolujte všechny získané události v grafu dot-plot Čas vs. CD235a FITC (data získaná pomocí BD FACSLytic™).

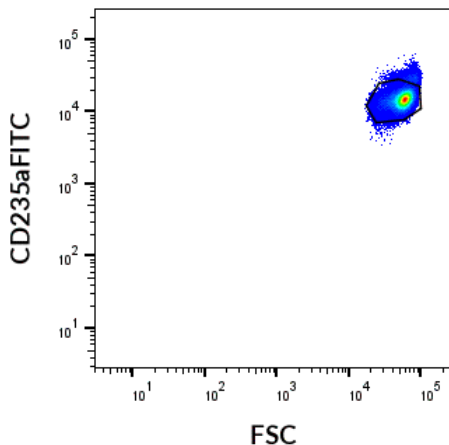


Obrázek 3a Zobrazte všechny události z časového regionu v grafu dot-plot FSC-A vs. SSC-A v logaritmickém režimu (data získaná pomocí BD FACSLytic™).



Zobrazte kompenzovaná data z regionu SSC vs. FCS v grafu dot-plot v logaritmickém režimu, kde osa X představuje FSC a osa Y intenzitu fluorescence v kanálu FITC. Nastavte region (gate) pro CD235a+ RBC singlety (obrázek 4).

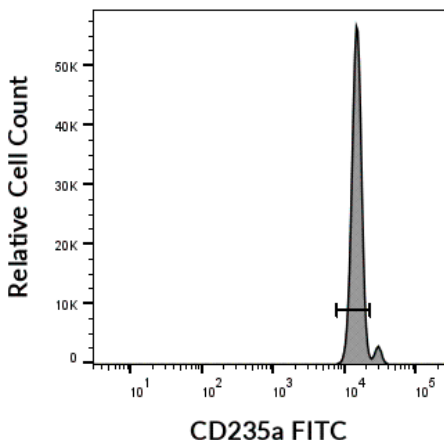
Obrázek 4 Vymezení CD235a+ RBC singletů (data získaná pomocí BD FACSLyric™).



Volitelné:

Pro lepší rozlišení singletů je možné zobrazit kompenzovaná data jako histogram, kde osa X představuje intenzitu fluorescence v kanálu FITC. Nastavte region „CD235a+ RBC singlets“ (obrázek 4a).

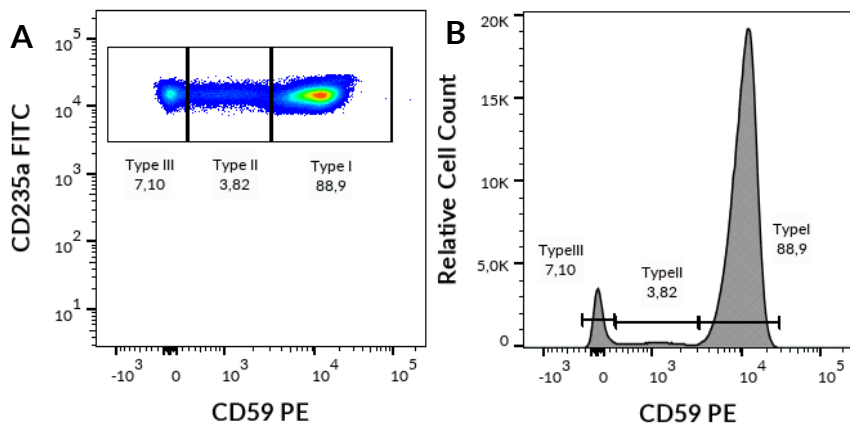
Obrázek 4a Vymezení CD235a+ RBC singletů (data získaná pomocí BD FACSLyric™).



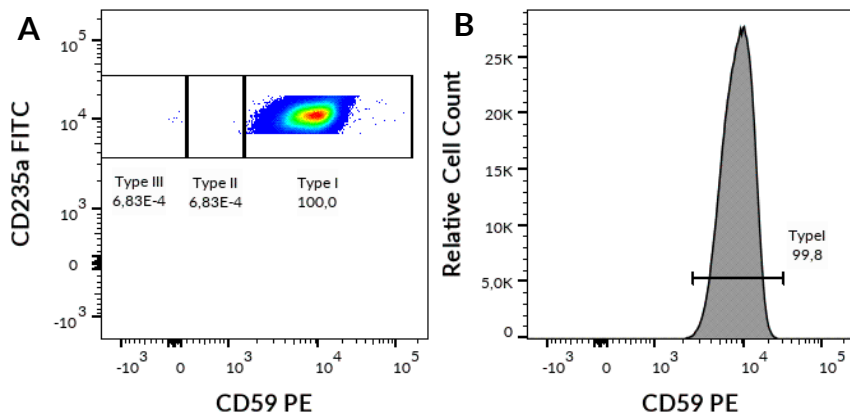
Erytrocyty

Zobrazte CD235a+ RBC singlety v grafu CD59 PE versus CD235a FITC. Rozdělte události do tří populací pomocí tří vhodných regionů (gatů) (obrázek 5a, 5b) a vypočítejte procento událostí v oblastech typu I, typu II a typu III. Pro lepší úpravu oblastí mezi typem II a III může být v některých situacích užitečný histogram.

Obrázek 5a Pacient s klonem PNH: A) CD235a+ RBC singlety v grafu CD59 PE versus CD235a FITC; B) CD235a+ RBC singlety v CD59 PE vs. histogram (data získaná pomocí BD FACSLytic™).



Obrázek 5b Zdravý dárce: A) CD235a+ RBC singlety v grafu dot-plot CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD235a+ RBC singlety v CD59 PE vs. histogram (data získaná pomocí BD FACS Lyric™).

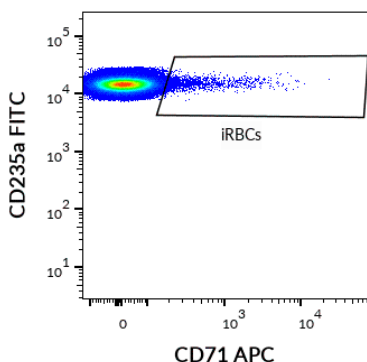


iRBCs (nezralé erytrocyty)

U pacientů, kteří dostávají krevní transfuze, může být obtížné určit skutečné procento RBCs PNH typu II a III. Zdravé červené krvinky od dárce krve cirkulující v krevním oběhu pacienta s PNH ovlivňují přesné procento velikosti klonů PNH. Přidání CD71 může být užitečné pro vyloučení dárcových transfuzních buněk ⁽⁶⁾.

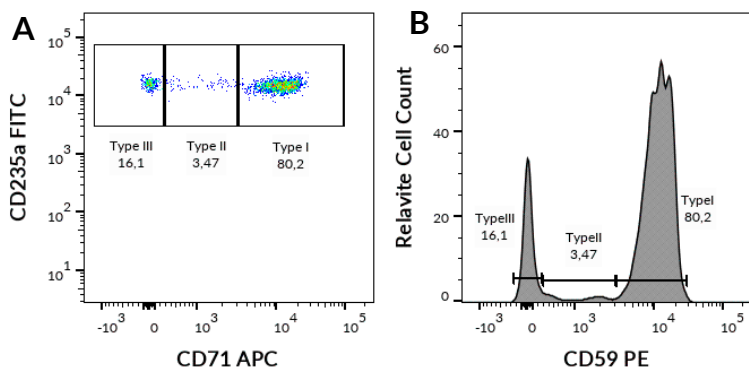
Zobrazte RBC singlety CD235a+ v grafu dot-plot CD71 APC versus CD235a FITC a oddělte CD71+ iRBCs (obrázek 6).

Obrázek 6 CD235a+ RBC singlety v grafu CD71 APC versus CD235a FITC. Oddělení CD71+ iRBC (data získaná na BD FACSCanto™ II).



Zobrazte CD71+ iRBC v grafu dot-plot CD59 PE versus CD235a FITC a CD59 PE versus histogram (obrázek 7). Rozdělte události do tří populací pomocí tří vhodných oblastí a vypočítejte procento událostí v oblastech typu I, typu II a typu III.

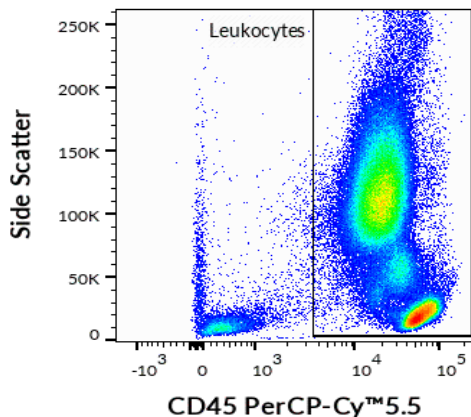
Obrázek 7 Pacient s PNH klonem, ale bez transfuze: A) CD71+ iRBCs v grafu dot-plot CD59 PE vs. CD235a FITC; B) CD71+ iRBC v CD59 PE vs. histogram (data získaná pomocí BD FACSLyric™).



PNH WBC 7-color zkumavka (modrý proužek)

Pro analýzu získejte alespoň 50 000 neutrofilů a 10 000 monocytů, což znamená získat alespoň 200 000 všech událostí. Zobrazte naměřená kompenzovaná data v grafu side-scatter (SSC) versus intenzita fluorescence v kanále PerCP-™5.5. Nastavte vhodný region (gate) pro CD45+ leukocyty, jak je znázorněno na obrázku 8.

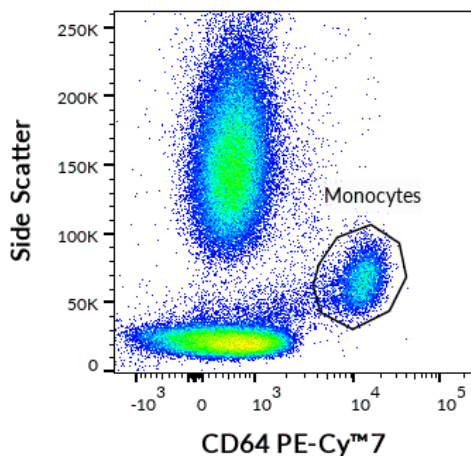
Obrázek 8 Ohraničení CD45+ leukocyte (data získaná na BD FACSLytic™).



Monocyty

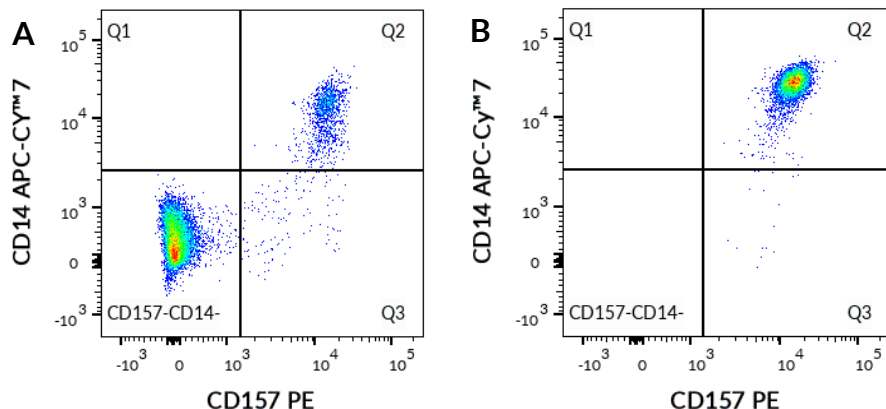
Zobrazte CD45+ leukocyty v grafu side-scatter (SSC) versus CD64 PE-Cy™7 a ohraničte populace CD64+ monocytů, jak je znázorněno na obrázku 9.

Obrázek 9 Ohraničení CD64+ monocytů z leukocytů (data získaná na BD FACSLytic™).



Zobrazte CD64+ monocyty v grafu CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (obrázek 10). Nastavte vhodné regiony a vypočítejte procento populace CD157-CD14-.

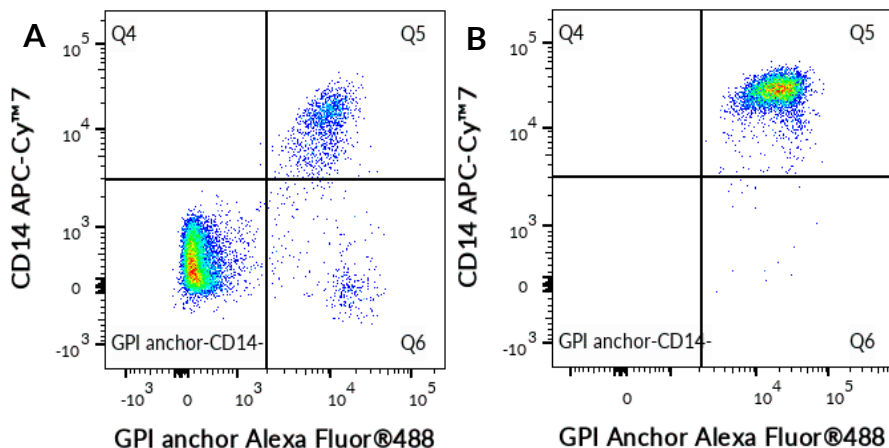
Obrázek 10 CD64+ monocyty v dot-plot CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (data získaná na BD FACSLyric™). A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD64+ monocyty v grafu dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) versus CD14 APC-Cy™7 (obrázek 11). Nastavte vhodné regiony a vypočítejte procento populace GPI kotva-CD14-.

Obrázek 11 CD64+ monocyty v dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 versus CD14 APC-Cy™7 (data získaná na BD FACSLyric™).

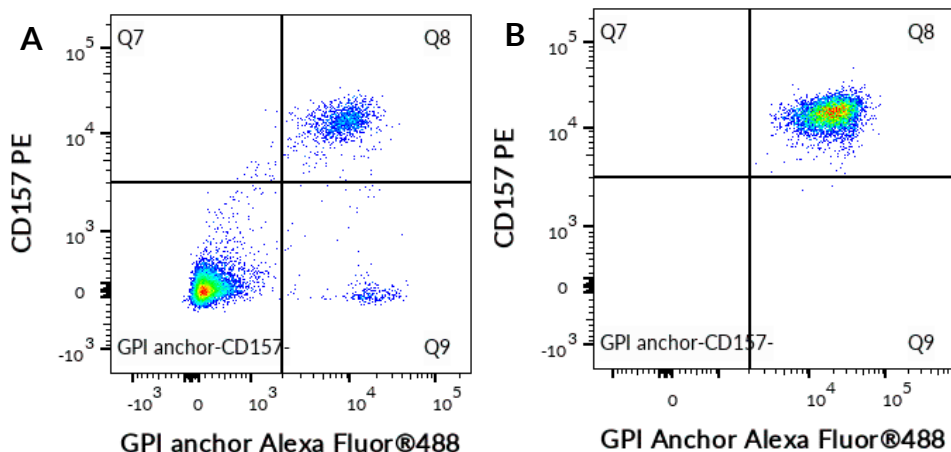
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD64+ monocyty v grafu dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) versus CD157 PE (obrázek 12). Nastavte vhodné regiony a vypočítejte procento populace GPI kotva-CD157-.

Obrázek 12 CD64+ monocyty v grafu dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 versus CD157 PE (data získaná na BD FACSLytic™).

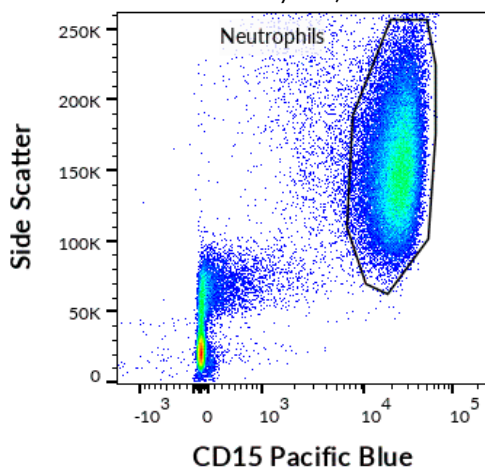
A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Neutrofilý

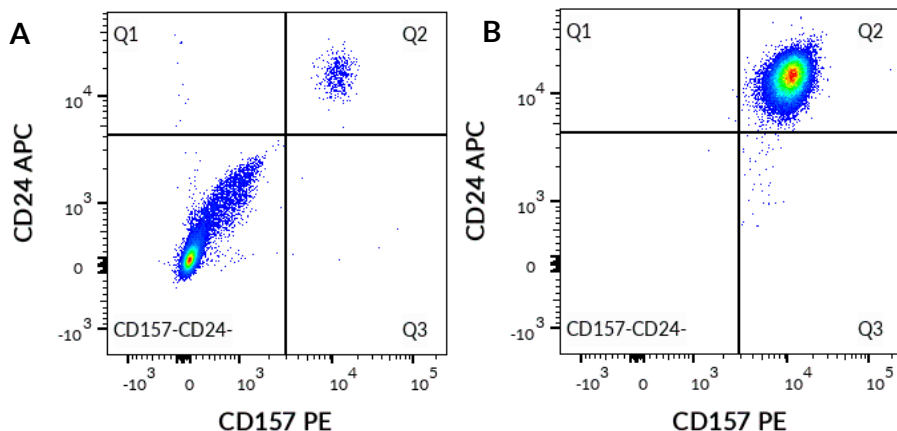
Zobrazte CD45+ leukocyty v grafu dot-plot side-scatter versus CD15 Pacific Blue™ a oddělte CD15+ neutrofilý, jak je znázorněno na obrázku 13.

Obrázek 13 Ohraničení CD15+ neutrofilů z leukocytů (data získaná pomocí BD FACSLytic™).



Zobrazte CD15+ neutrofilů v grafu dot-plot CD157 PE versus CD24 APC, jak je znázorněno na obrázku 14. Nastavte vhodné regiony a vypočítejte procento populace CD157-CD24-.

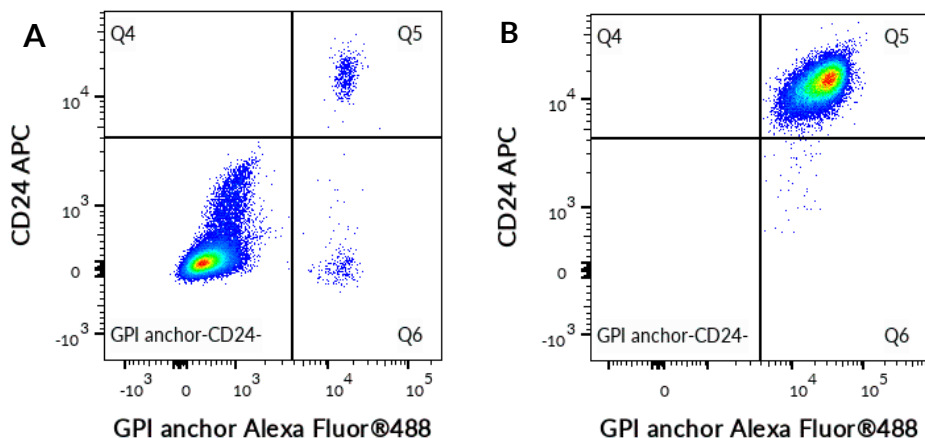
Obrázek 14 CD15+ neutrofilů v grafu dot-plot CD157 PE versus CD24 APC (data získaná na BD FACSLytic™). A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD15+ neutrofilů v grafu dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) versus CD24 APC. Nastavte vhodné regiony a vypočítejte procento populace GPI kotva-CD24-, jak je znázorněno na obrázku 15.

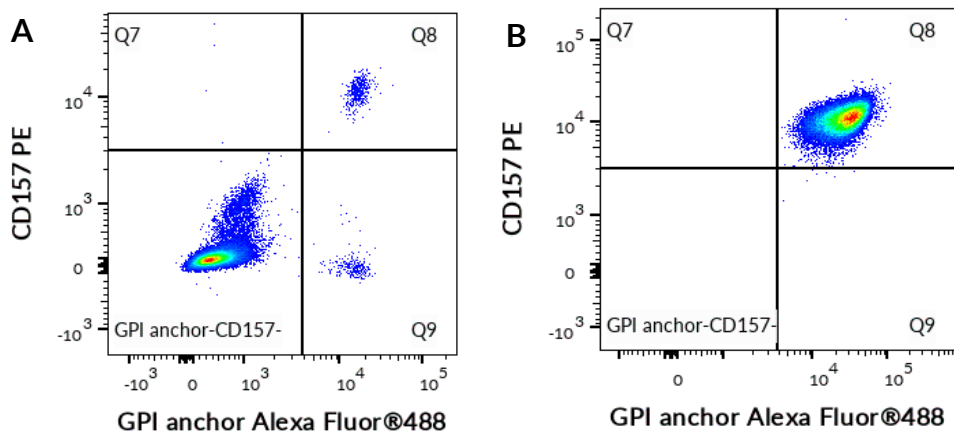
Obrázek 15 CD15+ neutrofilů v grafu dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 versus CD24 APC (data získaná na BD FACSLytic™).

A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Poté zobrazte stejné CD15+ neutrofilů v grafu dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) versus CD157 PE. Nastavte vhodné regiony a vypočítejte procento populace GPI kotva-CD157-, jak je znázorněno na obrázku 16.

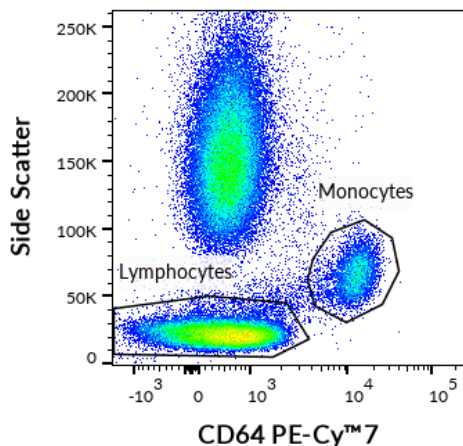
Obrázek 16 CD15+ neutrofilů v dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 versus CD157 PE (data získaná na BD FACSLytic™). A) pacient s klonem PNH; B) zdravý dárce



Interní kontrola

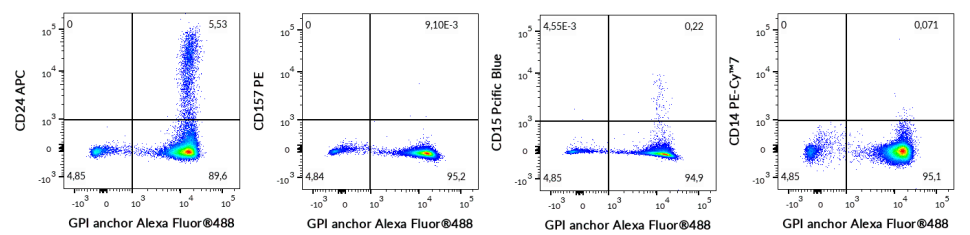
Pro ověření správného nastavení napětí a kompenzace fluorescenčních detektorů je nutné zobrazit interní kontroly (obrázek 18). V grafu CD64 PE-Cy™7 versus side scatter ohraničte lymfocyty jako výchozí populaci pro zobrazení interních kontrol (obrázek 17).

Obrázek 17 Ohraničení CD64 – lymfocytů z leukocytů (data získaná na BD FACSLytic™).



Poté zobrazte lymfocyty v grafu dot-plot GPI kotva Alexa Fluor® 488 (Proaerolysin) versus CD24 APC/CD157 PE/CD15 Pacific Blue™/CD14 PE-Cy™7 pro ověření nastavení napětí, kompenzace a výkonu protilátek (obrázek 18).

Obrázek 18 Interní kontroly (data získaná na BD FACSLyric™).



Výpočet a interpretace analytických výsledků

Vypočítejte procentuální zastoupení buněk s deficitem GPI (s PNH fenotypem), viz tabulka 5.

Tabulka 5 Fenotypy PNH klonů

Parentální populace buněk		PNH fenotyp podle nastavení regionů (gejtů)
PNH RBC 3-color zkumavka	Erytrocyty (Typ III)	CD59- CD235a+ (Obr. 5)
	Erytrocyty (Typ II)	CD59 dim CD235a+ (Obr. 5)
	iRBC (Typ III)	CD59- CD235a+CD71+(Obr. 7)
	iRBC (Typ II)	CD59 dim CD235a+CD71+(Obr. 7)
PNH WBC 7-color zkumavka	Monocyty	CD14- CD157- CD64+ (Obr. 10)
		CD14- GPI kotva- CD64+ (Obr. 11)
		CD157- GPI kotva- CD64+ (Obr. 12)
	Neutrofily	CD24- CD157- CD15+ (Obr. 14)
		CD24- GPI kotva- CD15+ (Obr. 15)
		CD157- GPI kotva- CD15+ (Obr. 16)

Tabulka 6 Interpretace výsledků

Limit detekce (LOD) pro zkumavky WBC a RBC je uvedený jako frekvence z parentální populace (%), vypočtený ze 100 měření z n=25 vzorků normálních pacientů na n=4 různých platformách cytometru				
PNH fenotyp	Průtokový cytometr			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
PNH RBC 3-color zkumavka				
CD59- Typ II a Typ III RBCs	0,005	0,002	0,029	0,049
CD59- Typ II a Typ III iRBC	0,240	0,320	0,388	0,562
PNH WBC 7-color zkumavka				
CD157- CD14- monocyty	0,20	0,19	0,14	0,30
GPI kotva- CD14- monocyty	0,08	0,04	0,10	0,17
GPI kotva- CD157- monocyty	0,07	0,06	0,04	0,03
CD157- CD24- neutrofilý	0,02	0,02	0,06	0,03
GPI kotva- CD24- neutrofilý	0,03	0,03	0,02	0,02
GPI kotva- CD157- neutrofilý	0,01	0,01	0,01	0,01

Pravidla algoritmu pro deficit GPI ⁽⁶⁾:

1. Zaznamenání PNH klonu v RBC zkumavce

Populace buněk	Frekvence	Výsledné prohlášení a akce ⁽⁶⁾
CD59– Typ II + Typ III RBCs	<LOD	„Žádná detekce PNH buněk“ Vzácné buňky PNH fenotypu zaznamenané pod hranicí detekce
	> 1 %	“Přítomnost PNH klonu” Lze hlásit procento buněk
	> LOD (Tabulka 6) <0,01 % ⁽⁶⁾	“Přítomnost PNH buněk” Vzácné buňky PNH fenotypu zaznamenané pod hranicí kvantifikace

2. Zaznamenání PNH klonu v WBC zkumavce

Populace buněk	Frekvence	Výsledné prohlášení a akce (6)
GPI kotva– CD14– Monocyty	<LOD	„Žádná detekce PNH buněk“ Vzácné buňky PNH fenotypu zaznamenané pod hranicí detekce
	> 1 %	“Přítomnost PNH klonu” Lze hlásit procento buněk
	> LOD (Tabulka 6); <LLOQ (Tabulka 13, 14)	“Přítomnost PNH klonu” Lze hlásit procento buněk
GPI kotva– CD24– Neutrofily	<LOD	„Žádná detekce PNH buněk“ Vzácné buňky PNH fenotypu zaznamenané pod hranicí detekce
	> 1 %	“Přítomnost PNH klonu” Lze hlásit procento buněk
	> LOD (Tabulka 6); <LLOQ (Tabulka 13, 14)	“Přítomnost PNH klonu” Lze hlásit procento buněk

3. Zaznamenání velikosti PNH klonu v RBCs.

Uvedte celkovou velikost PNH klonu a také procentuální zastoupení populace PNH typu II a typu III spolu s počtem buněčných populací získaných dle tabulky 7.

4. Zaznamenání velikosti PNH klonu v WBCs.

Uvedte velikost PNH klonu v obou liniích – neutrofilech i monocytech. WBC PNH klony se zdají být shlukované a méně rozptýlené než náhodné dvojité negativní události. Monocyty mohou vykazovat větší velikost PNH klonu než neutrofily ⁽²⁾. Deficit GPI (přítomnost PNH klonu) by měl být exprimován ve všech fenotypech PNH v dané podskupině leukocytů. Očekává se, že všechny PNH fenotypy monocytů (tabulka 5) budou barvit buňky s deficitem GPI podobně ⁽⁶⁾. Totéž platí

pro PNH fenotyp neutrofilů.

Terminologie zaznamenání PNH klonu (podle CLSI H52-A2):

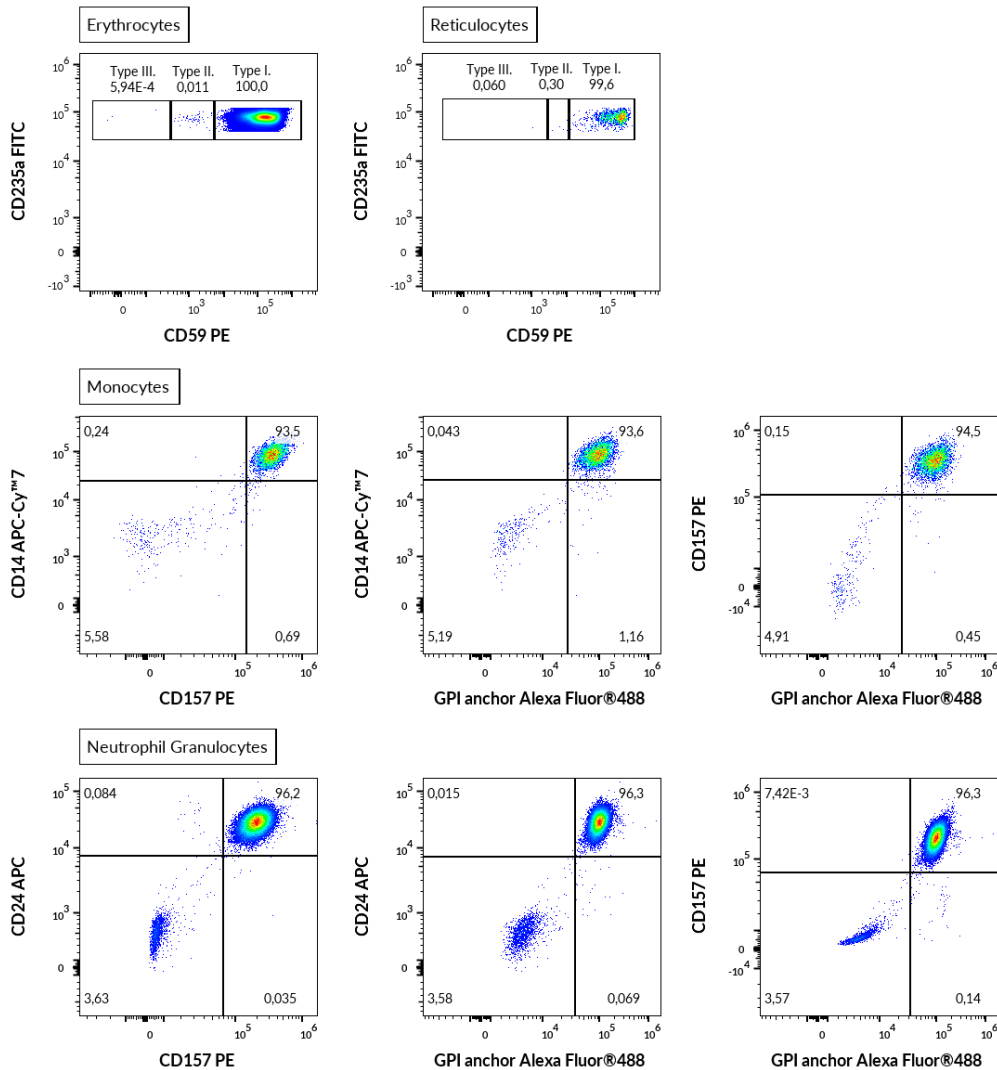
- a. PNH populace > 1 %: "PNH klon"
- b. PNH populace 0,1 % až 1 %: "menší PNH klon"
- c. PNH populace <0,1 %: "vzácné buňky s PNH fenotypem"

Tabulka 7 Příklady možných výsledků vyšetření (ne od jednoho pacienta) pro průtokový cytometr BD FACLyric™.

PNH fenotyp	Počet PNH událostí	Počet událostí v populaci rodičů	Frekvence	LLOQ	Hodnocení
CD59 – CD235a+ RBCs	3 události	521 023 RBCs singlety	0,0006 %	0,01 % ⁽⁶⁾	„Žádná detekce PNH buněk“ Vzácné buňky PNH fenotypu zaznamenané pod hranicí detekce
CD24 – GPI kotva – CD15+	69 851 událostí	75 849 neutrofilů	92,1 %	0,088 % (Tabulka 13)	“Detekce PNH klonu” 92,1 % neutrofilní velikost PNH klonu
CD14 – GPI kotva – CD64+	13 událostí	12 497 monocytů	0,103 %	0,141 % (Tabulka 13)	“Přítomnost PNH buněk; menší PNH klon” 0,103 % monocytární velikost PNH klonu

5. Do zprávy lze volitelně zahrnout **histogramy** a **grafy typu dot-plot**.

Obrázek 19 Příklad případu s přítomností PNH klonu ve WBC zkuhavce, přičemž PNH klon v RBC zkuhavce detekován nebyl (data získaná na Beckman Coulter DxFLEx).



11. Vlastnosti analytické funkce

Specifická

Proaerolysin Alexa Fluor® 488 je fluorescenčně značená varianta bakteriálního aerolysinu, který se specificky váže na GPI kotvy povrchových membránových proteinů v lidských buňkách^(1, 2, 5, 8).

Monoklonální protilátka SY11B5 rozpoznává extracelulární epitop na CD157 proteinu exprimovaného hlavně na monocytech a granulocytech. Specifická protilátky byla potvrzena na HCDM Council (HLDA X workshop).

Monoklonální protilátka 2D1 rozpoznává všechny leukocytární izoformy lidského CD45 antigenu (Leukocyte Common Antigen). Specifická protilátky byla potvrzena na HCDM Council (HLDA III workshop).

Monoklonální protilátka 10.1 rozpoznává lidský antigen CD64, který je exprimován na monocytech. Specifická protilátky byla potvrzena workshopy HLDA (HLDA III: workshop WS Code M-250).

Monoklonální protilátka SN3 reaguje s antigenem CD24 exprimovaným granulocyty. Specifická protilátky byla potvrzena workshopem HLDA (HLDA IV: WS kód B 136; HLDA V: WS kód B CD24.7).

Monoklonální protilátka MEM-15 reaguje s CD14, GPI (glykosylfosfatidylinositol)-vázaný extracelulární membránový glykoprotein exprimovaný na monocytech. Specifická protilátky byla potvrzena na HCDM Council (HLDA III: WS kód M 252; HLDA IV: WS kód M 113; HLDA IV: WS kód NL 90; HLDA IV: WS kód T 53; HLDA V: WS kód M MA086 ; HLDA VI: WS Code M MA94 workshop).

Monoklonální protilátka MEM-158 reaguje s CD15, silně exprimovaným na povrchu granulocytů. Specifická protilátky byla potvrzena na HCDM Council (HLDA VI: WS Code AS A053 workshop).

Monoklonální protilátka JC159 rozpoznává epitop na extracelulární části CD235a (glykoforin A), sialoglykoprotein exprimovaný na časných erytroblastech, pozdních erytroblastech, erytroblastech a zralých erytrocytech.

Monoklonální protilátka MEM-43 reaguje s dobře definovaným epitopem na CD59 (Protectin), (GPI)-ukotvený glykoprotein exprimovaný na povrchu všech hematopoetických buněk. Specifická protilátky byla potvrzena workshopem HLDA (HLDA IV: WS kód NL 705; HLDA V: WS kód AS S013; HLDA V: WS kód BP BP345; HLDA V: WS kód T T-103 workshop).

Monoklonální protilátka MEM-75 reaguje s extracelulárním epitopem CD71 antigenu exprimovaného na nezralých iRBC. Specifická protilátky byla potvrzena workshopem HLDA (HLDA IV: WS kód A 45; HLDA V: WS kód T T-165 workshop).

Přesnost

Přesnost metody byla stanovena porovnáním prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit s interní metodou akreditované klinické laboratoře (koktejl jednobarevných konjugovaných protilátek od různých výrobců analyzovaný pomocí BD FACSCanto™ II) paralelním barvením 13 pacientů s potvrzenou přítomností fenotypu PNH. Parametry lineární regresní analýzy jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Lineární regresní analýza relativního počtu populací buněk s deficitem GPI u pacientů s potvrzenou přítomností fenotypů PNH. Porovnání prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit analyzovaného pomocí BD FACSCanto™ II s interní metodou akreditované klinické laboratoře.

PNH fenotyp	n	Směrnice	Intercept	R ²	Rozsah [%]
CD59- CD235a+ Typ III erytrocyty	13	0,99	-0,026	1,00	1,28 – 83,79
CD59- CD235a+ Typ III RBCs	13	0,99	-0,384	1,00	5,97 – 97,78
CD59- CD235a+ Typ II erytrocyty	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 kotva- CD64+ monocyty	13	1,00	0,060	1,00	2,07 – 99,95
CD157- GPI kotva- CD15+ neutrofily	13	0,99	0,294	1,00	0,80 – 99,82
CD14- GPI kotva- CD64+ monocyty	13	Nebylo stanoveno			2,04 – 99,96
CD14- CD157- CD64+ monocyty	13	Nebylo stanoveno			2,17 – 99,96
CD24- CD157- CD15+ neutrofily	13	Nebylo stanoveno			0,80 – 99,83
CD24- GPI kotva- CD15+ neutrofily	13	Nebylo stanoveno			0,81 – 99,80

n = počet vzorků krve

Limit detekce

Limit detekce (LOD) byl stanoven pro každou cílovou populaci (viz tabulka 5) jako průměrná hodnota výsledků od 25 zdravých dárců krve zvýšená o tři směrodatné odchylky pro 4 různé platformy průtokového cytometru (tabulky 9, 10, 11 a 12).

Tabulka 9 Hodnoty LOD pro každý PNH fenotyp získané pomocí DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit na průtokovém cytometru BD FACSLytic™.

PNH fenotyp	BD FACSLytic™				
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	LOD (Mean + 3*SD)
RBC zkušavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)*					
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,003	0,001	5 – 48 událostí na 1.000.000 událostí	0,005 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,054	0,061	0 – 5 událostí na 3.000 iRBC	0,240 %
WBC zkušavka (získaných 50.000 neutrofilů a 10.000 monocytů)					
CD157- CD14-Monocyty	25	0,076	0,041	2 - 24 událostí na 10.000 Monocytů	0,20 %
GPI kotva- CD14-Monocyty	25	0,021	0,018	0 - 5 událostí na 10.000 Monocytů	0,08 %
GPI kotva- CD157-Monocyty	25	0,014	0,020	0 - 4 událostí na 10.000 Monocytů	0,07 %
CD157- CD24-Neutrofily	25	0,006	0,006	0 - 10 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,02 %
GPI kotva- CD24-Neutrofily	25	0,006	0,008	0 - 15 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,03 %
GPI kotva- CD157-Neutrofily	25	0,002	0,002	0 - 4 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,01 %

POZNÁMKA*: Pro analýzu varianty koktejlu protilátek v roztoku se doporučuje minimálně 98 % singletových událostí ⁽²⁴⁾. Sušená varianta koktejlu protilátek DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay obvykle umožňuje nižší frekvenci singletových událostí a 98% frekvence singletových událostí nemusí být dosaženo.

Tabulka 10 Hodnoty LOD pro každý PNH fenotyp získané pomocí DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II.

PNH fenotyp	BD FACSCanto II™				
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	LOD (Mean + 3*SD)
RBC zkumavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)					
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,0006	0,0004	1 - 12 událostí na 1.000.000 událostí	0,002 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,0657	0,0847	0 - 5 událostí na 1.000 iRBC	0,320 %
WBC zkumavka (získaných 50.000 neutrofilů a 10.000 monocytů)					
CD157- CD14- Monocyty	25	0,085	0,035	2 - 16 událostí na 10.000 Monocytů	0,19 %
GPI kotva- CD14- Monocyty	25	0,086	0,096	0 - 3 událostí na 10.000 Monocytů	0,04 %
GPI kotva- CD157- Monocyty	25	0,084	0,019	0 - 7 událostí na 10.000 Monocytů	0,06 %
CD157- CD24- Neutrofily	25	0,004	0,052	0 - 8 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,02 %
GPI kotva- CD24- Neutrofily	25	0,006	0,010	0 - 16 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,03 %
GPI kotva- CD157- Neutrofily	25	0,002	0,002	0 - 4 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,01 %

Tabulka 11 Hodnoty LOD pro každý PNH fenotyp získané pomocí DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit na průtokovém cytometru Beckman Coulter Navios EX.

PNH fenotyp	Beckman Coulter Navios EX				
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	LOD (Mean + 3*SD)
RBC zkušavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)					
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,007	0,007	4 - 236 událostí na 1.000.000 událostí	0,029 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,087	0,100	0 - 6 událostí na 1.000 iRBC	0,388 %
WBC zkušavka (získaných 50.000 neutrofilů a 10.000 monocytů)					
CD157- CD14-Monocyty	25	0,062	0,027	0 - 23 událostí na 10.000 Monocytů	0,14 %
GPI kotva- CD14-Monocyty	25	0,024	0,006	0 - 10 událostí na 10.000 Monocytů	0,10 %
GPI kotva- CD157-Monocyty	25	0,007	0,011	0 - 6 událostí na 10.000 Monocytů	0,04 %
CD157- CD24-Neutrofily	25	0,012	0,015	0 - 21 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,06 %
GPI kotva- CD24-Neutrofily	25	0,005	0,005	0 - 6 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,02 %
GPI kotva- CD157-Neutrofily	25	0,002	0,002	0 - 5 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,01 %

Tabulka 12 Hodnoty LOD pro každý PNH fenotyp získané pomocí DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit na průtokovém cytometru Beckman Coulter DxFLEx

PNH fenotyp	Beckman Coulter DxFLEx				
	n	Mean [%]	SD [%]	Výskyt PNH fenotypu	LOD (Mean + 3*SD)
RBC zkušavka (1.000.000 získaných událostí; min. 80% singletových RBC událostí)					
CD59- Typ II a Typ III RBC	25	0,015	0,012	5 - 48 událostí na 1.000.000 událostí	0,049 %
CD59- Typ II a Typ III iRBC	25	0,106	0,152	0 - 5 událostí na 1.000 iRBC	0,562 %
WBC zkušavka (získaných 50.000 neutrofilů a 10.000 monocytů)					
CD157- CD14- Monocyty	25	0,092	0,068	0 - 27 událostí na 10.000 Monocytů	0,30 %
GPI kotva- CD14- Monocyty	25	0,053	0,040	0 - 16 událostí na 10.000 Monocytů	0,17 %
GPI kotva- CD157- Monocyty	25	0,005	0,009	0 - 1 událost na 10.000 Monocytů	0,03 %
CD157- CD24- Neutrofily	25	0,010	0,008	0 - 14 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,03 %
GPI kotva- CD24- Neutrofily	25	0,008	0,006	0 - 10 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,02 %
GPI kotva- CD157- Neutrofily	25	0,002	0,002	0 - 3 událostí na 50.000 Neutrofilů	0,01 %

Limit kvantifikace

Dolní limit kvantifikace (LLOQ) byl stanoven sériovými ředěními (1:10, 1:100, 1:1000 a 1:10000) čerstvého vzorku PNH s čerstvým normálním vzorkem krve v triplikátu a analyzován pomocí průtokových cytometrů BD FACSLyric™ a Beckman Coulter DxFlex. Jako kritérium citlivosti pro LLOQ bylo zvoleno maximální CV 10 %.

Tabulka 13 Hodnoty frekvence LLOQ pro DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit získané na průtokovém cytometru BD FACSLyric™.

PNH fenotyp	Ředění	Počet PNH buněk	LLOQ	CV
CD59- Typ II and Typ III RBCs	1:10.000	101	0,029 %	3,9 %
CD157- CD14- Monocyty	1:10.000	28	0,677 %	2,3 %
GPI kotva- CD14- Monocyty	1:10.000	7	0,130 %	7,7 %
GPI kotva- CD157- Monocyty	1:10.000	2	0,018 %	9,9 %
CD157- CD24- Neutrofily	1:10.000	3	0,012 %	3,6 %
GPI kotva - CD24- Neutrofily	1:10.000	1	0,009 %	8,7 %
GPI kotva - CD157- Neutrofily	1:10.000	1	0,010 %	1,2 %

Tabulka 14 Hodnoty frekvence LLOQ pro DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit získané na průtokovém cytometru Beckman Coulter DxFLEX.

PNH fenotyp	Ředění	Počet PNH buněk	LLOQ	CV
CD59- Typ II and Typ III RBCs	1:10.000	101	0,005 %	9,1 %
CD157- CD14- Monocyty	1:10.000	22	0,143 %	4,0 %
GPI kotva- CD14- Monocyty	1:10.000	4	0,026 %	2,2 %
GPI kotva- CD157- Monocyty	1:10.000	11	0,068 %	5,9 %
CD157- CD24- Neutrofily	1:10.000	29	0,024 %	4,2 %
GPI kotva - CD24- Neutrofily	1:10.000	8	0,007 %	7,1 %
GPI kotva - CD157- Neutrofily	1:10.000	9	0,007 %	8,5 %

POZNÁMKA: Pro analýzu průtokovou cytometrií byly použity následující průtokové cytometry včetně verze softwaru:

- BD FACSCanto™ II

BD FACSLytic™

Beckman Coulter DxFLEX

Beckman Coulter Navios EX
- BD FACSDiva Software – verze 8.0.2

BD FACSuite™ Software – verze v1.5.0.925

CytExpert for DxFLEX – verze 2.0.2.18

Navios EX Software – verze 2.2

Pro vyhodnocení naměřených dat byla použita následující analytická platforma:
FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - verze 10.9.0

12. Vlastnosti klinické funkce

Pacienti s deficitem GPI

Klinická data byla shromážděna na klinickém místě od 19 pacientů, jak zdravých ⁽⁶⁾, tak pacientů s potvrzeným deficitem GPI ⁽¹³⁾. Vlastnosti klinické funkce byly stanoveny jako srovnání prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit s akreditovanou vlastní klinickou laboratorní metodou (koktejl jednobarevných konjugovaných protilátek od různých výrobců a analyzovaných pomocí BD FACSCanto™ II).

Deficit GPI u pacientů byl hodnocen s ohledem na použitou metodu (tabulka 15) s pomocí detekce buněk s deficitem GPI (PNH klony).

Tabulka 15 Klinická funkce prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Hodnocení deficitu GPI pomocí akreditované vlastní klinické laboratorní metody	
		Deficit GPI	Normální stav
Hodnocení deficitu GPI pomocí prostředku DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Deficit GPI	13 pacientů	0 pacientů
	Normální stav	0 pacientů	6 pacientů

13. Očekávané hodnoty

Referenční interval

V normální populaci není detekován žádný nedostatek GPI a očekává se, že všechny procentuální hodnoty fenotypu PNH budou nižší, než mezní hodnota testu (LOD) ⁽⁶⁾.

14. Omezení

Nebyla zjištěna žádná omezení pro použití u specifických typů onemocnění, jako např. anémie.

Reportování záchyty GPI deficiencie je limitováno současným stavem poznání uvedeným v publikovaných pokynech ⁽⁶⁾.

PNH klon není v lymfocytech detekován, protože se vyskytuje častěji v neutrofilech a monocytech, než ve zralých lymfocytech, což naznačuje, že lymfoidní buňky mají dlouhou životnost a mohou existovat před vznikem nebo expanzí PNH klonu.

15. Odkazy

- 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. Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti

Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti bude k dispozici v databázi Eudamed na adrese <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Do té doby je souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti k dispozici na vyžádání.

17. Použití ochranných známek třetích stran

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™ a FlowJo™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson a Company. Cy™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytiva. VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L. SPHERO™ COMPTrol je registrovaná ochranná známka firmy Spherotech, Inc.

18. Historie revizí

Verze 4, ED7750_IFU_v4

- 1) Kapitola „Vzorek“ byla aktualizována.
- 2) Byla aktualizována upozornění v kapitole 10.
- 3) Byly aktualizovány oddíly „PNH RBC 3-color zkušavka“ a „PNH WBC 7-color zkušavka“, včetně obrázků v kapitole 10.

- 4) Byla přidána sekce „Interní kontrola“ v kapitole 10.
- 5) Bylo přidáno upozornění v sekci „Výpočet a interpretace analytických výsledků“.
- 6) Byla aktualizována sekce „Pravidla algoritmu pro hlášení deficitu GPI“.
- 7) Byla aktualizována sekce 11 „Vlastnosti analytické funkce“.
- 8) Byla aktualizována sekce „Omezení“.
- 9) Opraveno číslování článků v sekci „Odkazy“.

19. Výrobce

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

Kontaktní informace

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

20. Zplnomocněný zástupce

N/A

POZNÁMKA: Jakákoli vážná událost, která se vyskytla v souvislosti s prostředkem, musí být oznámena výrobcí a místnímu příslušnému úřadu.