

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

25 testes | Cat. N.º ED7750

IVD **CE** 2265

Instruções de Utilização (PT)

Versão: ED7750_IFU_v4_PT
Data de emissão: 13-03-2026

Símbolos utilizados na etiquetagem do dispositivo

IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Limites de temperatura
CE 2265	Marca CE de conformidade Número de identificação do órgão notificado		Manter afastado da luz solar
	Fabricante		Manter em local seco
UDI	Identificador Único de Dispositivo		Cuidado
	Consultar instruções de utilização		Não reutilizar
	Contém o suficiente para <n> testes	TUBE	Contém <n> tubos para testes de uso único
REF	Número de catálogo	CONC 10×	Solução concentrada (10x)
LOT	Código de lote	CONTENTS	Conteúdos
	Data de validade	UKCA	Marca UKCA

1. Finalidade prevista

O Kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay destina-se à detecção de alta sensibilidade e enumeração de células com deficiência de glicofosfatidilinositol (GPI) no sangue total humano por citometria de fluxo.

O que é detetado e/ou medido

O dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit deteta e enumera células com deficiência de glicofosfatidilinositol (GPI) (clones PNH) como percentagem de:

- células CD59 dim ou CD59- de todos os eritrócitos (CD235a+)
- células CD59 dim ou CD59- de todos os iRBCs (CD235a+CD71+)
- células CD14-, CD157- e âncora GPI- de todos os monócitos (CD45+CD64+)
- células CD24-, CD157- e âncora GPI- de todos os neutrófilos (CD45+CD15+)

Função do dispositivo

O dispositivo destina-se ao diagnóstico e monitorização de pacientes que sofram ou que se suspeite sofrerem de Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) e distúrbios relacionados ⁽¹⁾.

Contexto do estado fisiológico ou patológico

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença rara das células-tronco hematopoéticas que surge como consequência da expansão clonal não maligna das células com mutação somática do gene da Biossíntese da Âncora de Fosfatidilinositol Glicano (PIGA) de Classe A. As mutações do gene PIGA resultam na incapacidade de expressar proteínas da superfície celular ancoradas no glicofosfatidilinositol (GPI).

O dispositivo destina-se a detetar neutrófilos e monócitos com deficiência de GPI ⁽¹⁾, juntamente com eritrócitos com deficiência completa (Tipo III) e parcial (Tipo II) de GPI ^(2,3,4,5,6) para avaliação da dimensão do clone de HPN.

Adicionalmente, o dispositivo deteta iRBCs com deficiência de GPI (eritrócitos imaturos) em pacientes que recebam transfusões sanguíneas quando os eritrócitos de HPN são difíceis de delinear ⁽⁷⁾.

Tipo de ensaio

Não automatizado

Quantitativo

Tipo de espécime requerido

Amostra de sangue total periférico humano anticoagulado (EDTA, heparina, citrato) ⁽¹⁾

População de teste

Pacientes com:

- Marcadores laboratoriais de hemólise, quando outras causas mais comuns de hemólise tiverem sido excluídas,
- Tromboses inexplicadas em faixa etária jovem,
- Tromboses diagnosticadas num local incomum,
- Anemia aplástica (AA) herdada ou adquirida,
- Síndrome mielodisplásica (SMD),
- Citopenia inexplicada na qual a AA ou a SMD sejam considerações de diagnóstico diferencial ⁽¹⁾

2. Utilizador pretendido

O dispositivo destina-se apenas a uso profissional em laboratório. Não para testes próximos dos pacientes ou autoteste.

Requisitos de qualificação

O utilizador previsto deve possuir conhecimentos especializados de ponta em análise de citometria de fluxo de células humanas, técnicas laboratoriais padrão, incluindo técnicas de pipetagem, manipulação segura e adequada de espécimes derivados do corpo humano.

O utilizador previsto deve cumprir a norma EN ISO 15189 ou outras disposições nacionais, quando aplicável.

3. Princípio de análise

O princípio do teste baseia-se na deteção da âncora do GPI e das proteínas ancoradas em GPI na superfície das células sanguíneas humanas. Os anticorpos monoclonais e a proaerolisina recombinante usados no teste são rotulados com diferentes fluorocromos que são excitados por um feixe de laser de um citómetro durante a aquisição de uma amostra de sangue corado. A fluorescência subsequente (emissão de luz) de cada fluorocromo presente numa célula de sangue adquirida é recolhida e analisada pelo instrumento. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à densidade da expressão do antígeno numa célula, permitindo a separação de diferentes subconjuntos de células.

4. Reagente(s) fornecido(s)

Conteúdos

O dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, suficiente para análise de 25 pacientes, é fornecido com os seguintes reagentes:

PNH High-Sensitivity Assay (25 bolsas). Cada bolsa consiste em 1 tubo de uso único com tampa com código de cor (faixa ciano) **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) e 1 tubo de uso único com tampa com código de cor (faixa vermelha)

PNH RBC 3-color (ED7750-2), que contém combinações previamente misturadas de reagentes rotulados com fluorocromo e secadas com os ingredientes estabilizadores como camada no fundo dos tubos de ensaio (12 x 75 mm); consulte as Tabelas 1 e 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 frasco) contendo 15 ml de solução tamponada concentrada (10X) à base de formaldeído.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 bolsa) contendo 10 tubos de uso único com tampa, cada uma com um único reagente rotulado com fluorocromo que foi secado com os ingredientes estabilizadores como camada no fundo do tubo (12x75 mm).

CUIDADO: O Conjunto de Compensação PNH destina-se apenas à preparação da compensação. Os reagentes únicos rotulados com fluorocromo (ver Tabela 1 e Tabela 2) permitem um procedimento de compensação fácil e preciso.

Composição

Tabela 1 Descrição dos ingredientes ativos PNH WBC 7-color

Antígeno	Fluorocromo	Clone	Isótopo
Âncora GPI (proaerolisina)	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

Tabela 2 Descrição dos ingredientes ativos PNH RBC 3-color

Antígeno	Fluorocromo	Clone	Isótopo
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Materiais necessários, mas não incluídos

- Água desionizada (Reagent-grade)
- Solução salina de fosfato tamponada (1X PBS), pH 7.2 – 7.4
- Partículas de compensação da citometria de fluxo (Spherotech SPHERO™ COMPtrol Kit, Cat. No. CMLgP-50-3K ou partículas de compensação equivalentes)

6. Equipamento necessário

- Pipeta automática com pontas descartáveis (100 µl – 5 ml) para pipetagem de espécimes e reagentes
- Dispensador de líquidos ou pipeta com pontas descartáveis (2 ml) para dispensação de solução de lisagem de eritrócitos
- Misturador Vortex
- Tubos centrífugos cónicos em polipropileno (15 ml ou 50 ml) para preparação de amostras
- Centrifugadora com adaptadores de rotor apropriados para tubos de fundo redondo com 12 x 75 mm
- Citómetro de fluxo com três fontes de excitação a laser (488 nm, ~635 nm e 405 nm), detetores para espalhadores, filtros óticos e detetores de emissões apropriados para recolher os sinais de fluorocromos indicados na Tabela 3.

Tabela 3 Característica espectral dos fluorocromos utilizados no dispositivo

Fluorocromo	Excitação [nm]	Emissões [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

AVISO: O dispositivo foi testado em citómetros de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biociências), BD FACSLytic™ (BD Biociências), Navios EX (Beckman Coulter) e DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 20 -30 °C.

Evitar a exposição prolongada à luz.

Mantenha seco.

CUIDADO: Produto sensível à humidade. Não abrir a bolsa de alumínio até à primeira utilização.

Consulte o Procedimento da Secção 10 (Preparação do(s) reagente(s) fornecido(s)) para informações sobre as condições de armazenamento e a estabilidade das soluções ativas (quando aplicável).

8. Avisos, precauções e limitações de utilização

Classificação de Perigos GHS

ADVERTÊNCIA: Lysing Solution (ED7750-3) contém formaldeído (CAS No. 50-00-0) e metanol (CAS No. 67-56-1) em concentrações classificadas como perigosas.

Elementos de etiqueta	Palavra de sinal
	Perigo
	
Frases H	H302: Nocivo por ingestão. H315: Provoca irritação cutânea. H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H319: Provoca irritação ocular grave. H331: Tóxico por inalação. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias. H341: Suspeito de provocar anomalias genéticas. H350: Pode provocar cancro. H371: Pode afectar os órgãos. H373: Pode afectar os rins após exposição prolongada ou repetida por ingestão. EUH071: Corrosivo para as vias respiratórias.
Frases P	P201: Pedir instruções específicas antes da utilização. P260: Não respirar as vapores. P280: Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial. P308+P313: EM CASO DE exposição ou suspeita de

exposição: consulte um médico. P403+P233: Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.

Consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS) disponível na página do produto em www.exbio.cz para obter informações completas sobre os riscos colocados pelas substâncias e misturas químicas contidas no Produto e como devem ser manuseadas e eliminadas.

Perigo biológico

Amostras biológicas humanas e amostras de sangue e quaisquer materiais que entrem em contacto com elas são sempre considerados como materiais infecciosos.

Utilizar equipamento de proteção pessoal e de segurança para evitar o contacto com a pele, olhos e membranas mucosas.

Seguir todas as leis, regulamentos e procedimentos aplicáveis para o manuseamento e eliminação de materiais infecciosos.

Evidência de deterioração

O aspeto normal do reagente fornecido é uma camada seca transparente no fundo do tubo. Não utilizar o reagente se observar qualquer alteração na aparência, por exemplo, presença de humidade no interior do tubo.

Limitação de utilização

Não utilizar após a data de validade indicada nos rótulos dos produtos.

Não reutilizar os tubos de ensaio.

9. Espécime

Utilize sangue venoso periférico colhido num recipiente de amostra classificado como dispositivo médico, com anticoagulante EDTA, heparina ou ACD (Acid Citrate Dextrose) ⁽¹⁾.

Utilize apenas o espécime não tratado. Não utilize espécimes pré-lisados, lavados ou diluídos.

Processar a amostra de sangue no prazo de 48 horas após a colheita. Manter a amostra à temperatura laboratorial (20-25°C) se for processada no prazo de 24 horas. Se o processamento for adiado para além de 24 horas, mas menos de 48 horas, refrigerar a amostra ⁽¹⁾.

Interferência Endógena

Com base na investigação da literatura científica, as fontes de interferência endógenas são identificadas na Tabela 4.

Tabela 4 Interferência Endógena do dispositivo

Interferência Endógena	Impacto	Referência
Albumina	A albumina pode interferir em concentrações elevadas devido à sua capacidade de se ligar e de libertar grandes quantidades de ligandos.	9, 10, 11
Bilirrubina (itêria) (não conjugado)	A bilirrubina aumenta o fundo de fluorescência das células devido à sua elevada autofluorescência.	12, 13, 14
Resíduos celulares (após lise)	Os detritos celulares podem provocar contagens incorretas de células e esgotar o anticorpo no dispositivo.	15, 16
Eritrócitos	Uma lise insuficiente e a presença de glóbulos vermelhos na amostra podem conduzir a uma contagem incorreta de células.	17
Hemoglobina	As amostras hemolisadas podem produzir resultados pouco fiáveis.	18
Anticorpos humanos anti-murinos	Pode afetar a funcionalidade do dispositivo (capacidade de se ligar a antígenos de superfície celular).	19
Imunoglobulinas	Pode afetar a contagem de subgrupos de linfócitos.	12
Fatores reumatóides	A presença de RF (fator reumatoide) interfere com os MIA (imunoensaios multiplex).	20
Triglicéridos	Níveis elevados de lípidos em circulação podem afetar a análise por citometria de fluxo de determinadas populações de células sanguíneas.	21

Interferência Exógena

De acordo com artigos publicados por Sutherland et. al. ⁽⁷⁾, os glóbulos vermelhos provenientes de transfusões de sangue são uma interferência importante na análise da HPN em pacientes com um clone grande de HPN que sofram de hemólise extravascular. Os eritrócitos saudáveis recebidos por transfusão afetam significativamente a monitorização do clone da HPN na linhagem de glóbulos vermelhos (RBC). A adição de CD71 melhora significativamente a capacidade de analisar os tamanhos dos clones de HPN na linhagem de hemácias, independentemente do estado hemolítico e/ou transfusional do paciente.

O dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit resolve este problema de acordo com as diretrizes anteriormente mencionadas, oferecendo o antígeno CD71 para a identificação de glóbulos vermelhos imaturos (iRBC), em que os iRBC também expressam o antígeno CD59 ancorado em GPI. Nos sacos de transfusão, os glóbulos vermelhos imaturos são normalmente representados numa quantidade muito baixa ⁽²²⁾. Por outro lado, os pacientes que sofrem hemólise extravascular causada pela HPN têm um aumento na contagem de glóbulos vermelhos imaturos devido à rápida perda de eritrócitos ⁽²³⁾. Assim, com a adição do anticorpo monoclonal CD71 para a identificação de glóbulos vermelhos imaturos, o médico pode monitorizar com maior precisão a progressão da HPN, que se manifesta pela perda do antígeno CD59 nos glóbulos vermelhos imaturos, ultrapassando a interferência de glóbulos vermelhos exógenos provenientes dos sacos de transfusão. O DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit contém o anticorpo CD71 anti-humano e permite a utilização das diretrizes mais recentes para a deteção e quantificação de clones de HPN.

10.Procedimento

Preparação do(s) reagente(s) fornecido(s)

PNH High-Sensitivity Assay

Não é necessária preparação de reagentes, são fornecidos em tubos de ensaio apenas para uso único.

Lysing Solution

Colocar o reagente à temperatura ambiente antes de o utilizar.

O reagente é concentrado 10X e deve ser diluído com água desionizada antes da utilização (1 volume da solução concentrada e 9 volumes de água desionizada). Após a primeira abertura, o reagente mantém as suas características de desempenho até ao termo do prazo de validade, quando conservado nas condições previstas, no seu recipiente primário de origem.

A solução de lise diluída (1X) é estável durante 1 mês quando armazenada num dispensador de líquidos ou recipiente fechado à temperatura ambiente.

Preparação de materiais necessários, mas não incluídos

Partículas de compensação

Prepare a solução ativa de partículas de compensação da citometria de fluxo de acordo com as instruções do fabricante.

Preparação da compensação

Adquira tubos de Set de Compensação usando a mesma configuração do citómetro de fluxo, antes da análise dos tubos de PNH RBC 3-color e de PNH WBC 7-color.

CUIDADO: Os procedimentos de preparação da compensação de PNH RBC 3-color e de PNH WBC 7-color diferem no tipo de preparação de espécimes e de coloração da amostra.

Tubos de compensação PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

1. Adicione o **Kit SPHERO™ COMPtrol** ou **partículas de compensação equivalentes** no fundo de cada tubo de compensação de cor única.
2. Coloque no agitador Vortex e incube os tubos de ensaio durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
3. Adicione 4 ml de 1X PBS a cada tubo de compensação. Centrifugue 5 minutos a 300 ×g.
4. Descarte o sobrenadante sem perturbar as partículas de compensação e adicione 0,1 ml de 1X PBS a cada tubo de compensação.
5. Defina as tensões nos detetores de fluorescência de interesse antes da análise de amostras coradas. A tensão num detetor de PMT deve ser definida suficientemente alta, para que o mínimo de eventos com manchas negativas interfira com o 0.º canal no eixo de fluorescência. Além disso, a tensão do detetor de PMT não deve exceder os valores em que os eventos positivos são pressionados para o eixo direito.
6. Adquira os tubos de compensação corados imediatamente usando o citómetro de fluxo.
7. Calcule a matriz de compensação PNH RBC 3-color no software do citómetro, desenvolvido pelo fabricante, ou no software dedicado à análise de dados de citometria offline. Use esta matriz de compensação para todos os tubos de ensaio deste lote de PNH RBC 3-color.

CUIDADO: Uma vez ajustadas para o lote específico de PNH RBC 3-color, não altere as definições dos detetores de fluorescência para reter as mesmas definições de aquisição da matriz de compensação e os mesmos resultados de compensação.

Tubos de compensação PNH WBC 7-color (faixa ciano)

1. Adicione 50 µl de água deionizada no fundo de cada tubo de compensação de cor única e coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa durante 7-10 segundos.
2. Adicione **100 µl de sangue total periférico a cada tubo de compensação de cor única** e coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa.

3. Incube os tubos de ensaio durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
4. Adicione 2 ml de solução de lisagem diluída (1X) a cada tubo de compensação.
5. Incube os tubos de ensaio durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
6. Centrifugue durante 5 minutos a 300 ×g, descarte o sobrenadante e volte a suspender o agregado de células em 2 ml de 1X PBS.
7. Centrifugue durante 5 minutos a 300 ×g, descarte o sobrenadante e volte a suspender o agregado de células em 0,2 ml de 1X PBS.
8. Defina as tensões nos detetores de fluorescência de interesse antes da análise de amostras coradas. A tensão num detetor de PMT deve ser definida suficientemente alta, para que o mínimo de eventos com manchas negativas interfira com o 0.º canal no eixo de fluorescência. Além disso, a tensão do detetor de PMT não deve exceder os valores em que os eventos positivos são pressionados para o eixo direito.
9. Adquira os tubos de compensação corados imediatamente usando o citómetro de fluxo.
10. Calcule a matriz de compensação PNH WBC 7-color no software do citómetro, desenvolvido pelo fabricante, ou no software dedicado à análise de dados de citometria offline. Use esta matriz de compensação para todos os tubos de ensaio deste lote de PNH WBC 7-color.

CUIDADO: Uma vez ajustadas para o lote específico de PNH WBC 7-color, não altere as definições dos detetores de fluorescência para reter as mesmas definições de aquisição da matriz de compensação e os mesmos resultados de compensação.

Preparação de amostras

A detecção e diferenciação de clones PNH em eritrócitos usando o tubo PNH RBC 3-color requer preparação de amostras antes do procedimento de coloração.

AVISO: Antes de processar a amostra, garanta que o citómetro foi devidamente preparado.

1. Rotule um tubo cónico de polipropileno com a identificação da amostra de sangue examinada.
2. Extraia com uma pipeta 10 µl de amostra de sangue bem misturada para o fundo do tubo cónico rotulado.

3. Dilua a amostra de sangue: 1:100 com 1 ml de 1X PBS e misture à mão, oscilando-a durante 5 segundos.

CUIDADO: A forma clássica de PNH é dominada pela hemólise intravascular. Antes de diluir a amostra de sangue, consulte os valores de RBC do analisador hematológico para atingir os valores de RBC da amostra de sangue diluído no intervalo de $3 - 5 \times 10^7$ / ml de sangue diluído e ajuste o fator de diluição conforme necessário para adquirir valores suficientes de RBC no citômetro de fluxo.

4. Realize o procedimento de coloração da amostra imediatamente após a diluição da mesma.

A detecção de células com deficiência de GPI em neutrófilos usando o tubo PNH WBC 7-color não requer preparação de amostras antes do procedimento de coloração.

Coloração de amostra - tubo PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

1. Rotule um tubo PNH RBC 3-color com a identificação da amostra de sangue examinada.
2. **Extraia com uma pipeta 50 µl de amostra de sangue diluída e bem misturada** para o fundo do tubo PNH RBC 3-color.

CUIDADO: Evite a pipetagem de sangue na lateral do tubo de ensaio. Se o esfregaço ou gota de sangue permanecer na lateral do tubo, poderá não ser tingido com o reagente e os resultados do teste podem não ser válidos.

3. Coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa durante 7-10 segundos.

CUIDADO: O encurtamento do tempo no Vortex poderá afetar os resultados do teste.

4. Incube o tubo PNH RBC 3-color durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
5. Adicione 4 ml de 1X PBS ao tubo PNH RBC 3-color.
6. Centrifugue o tubo PNH RBC 3-color durante 5 minutos a 300 ×g.
7. Descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células e adicione 0,5 ml de 1X PBS ao tubo PNH RBC 3-color.
8. Colocar no Vortex brevemente para voltar a suspender o agregado de células.

Adquira a amostra corada usando o citômetro de fluxo. Se a amostra corada não for adquirida imediatamente, tapar o tubo de ensaio, armazenar a 2-8 °C no escuro e analisar no prazo de 2 horas.

CUIDADO: Desfazer os agregados celulares na amostra corada fazendo deslizar o tubo de ensaio 6-10 vezes contra a parte superior do suporte de tubos imediatamente antes da aquisição no citômetro de fluxo. Um montante excessivo de agregados de RBC poderá afetar os resultados do teste.

Coloração de amostra - tubo PNH WBC 7-color (faixa ciano)

1. Rotule um tubo PNH WBC 7-color com a identificação da amostra de sangue examinada.
2. Adicione **50 µl de água deionizada** ao tubo de ensaio PNH WBC 7-color. Coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa durante 7-10 segundos.

CUIDADO: O encurtamento do tempo no Vortex poderá afetar os resultados do teste.

3. Extraia com pipeta **100 µl de amostra de sangue bem misturada** para o fundo do tubo de ensaio PNH WBC 7-color e agite suavemente no Vortex.

CUIDADO: Evite colocar com a pipeta o sangue na lateral do tubo de ensaio. Se o esfregaço ou gota de sangue permanecer na lateral do tubo, poderá não ser tingido com o reagente e os resultados do teste podem não ser válidos.

4. Incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
5. Adicione 2 ml de 1X solução ativa de lisagem de eritrócitos ao tubo PNH WBC 7-color.
6. Incube os tubos de ensaio durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
7. Centrifugue o tubo PNH WBC 7-color durante 5 minutos a 300 ×g.
8. Descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células e adicione 2 ml de 1X PBS ao tubo de ensaio.
9. Centrifugue o tubo PNH WBC 7-color durante 5 minutos a 300 ×g.
10. Descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células e adicione 0,2 ml de 1X PBS ao tubo de ensaio.
11. Colocar no Vortex brevemente para voltar a suspender o agregado de células.

Adquira a amostra corada usando o citômetro de fluxo. Se a amostra corada não for adquirida imediatamente, tapar o tubo de ensaio, armazenar a 2-8 °C no escuro e analisar no prazo de 24 horas.

Análise de citometria de fluxo

O medidor de caudal selecionado para utilização com o dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit deve ser calibrado numa base de rotina utilizando micro esferas fluorescentes para assegurar uma sensibilidade estável dos detetores de acordo com as instruções do fabricante do medidor de caudal.

Se não for mantido corretamente, o ocitómetro defluxopode produzir resultados falsos.

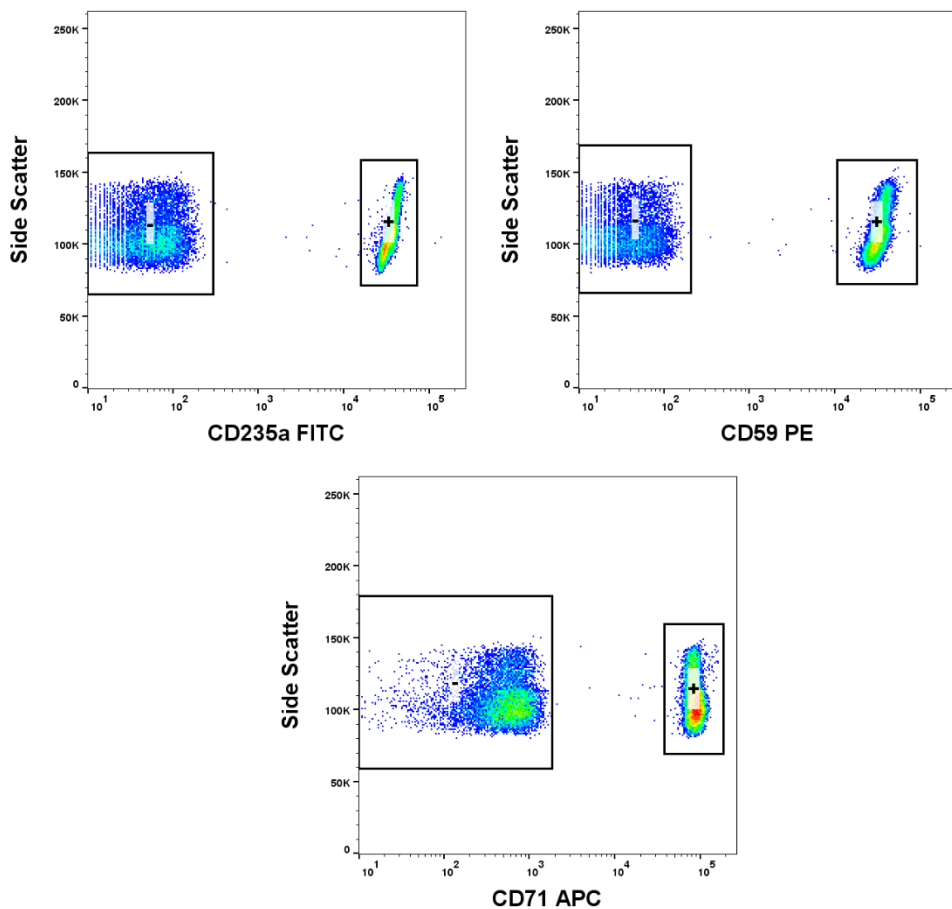
Consultar as especificações do fabricante para os lasers e detetores fluorescentes de acordo com as características de excitação e emissão dos fluorocromos na Secção 6 Equipamento necessário.

Para a análise de dados medidos, é possível utilizar software de citómetro desenvolvido pelo fabricante, ou software dedicado à análise de dados de citometria offline (por exemplo FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Análise de tubos de compensação PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

Visualize os dados não compensados de cada tubo de compensação numa dispersão lateral (SSC) versus um diagrama de pontos de “fluorocromo a ser compensado”. Defina os limites para as partículas de compensação positivas (+) e negativas (-) da citometria, conforme representado na Figura 1.

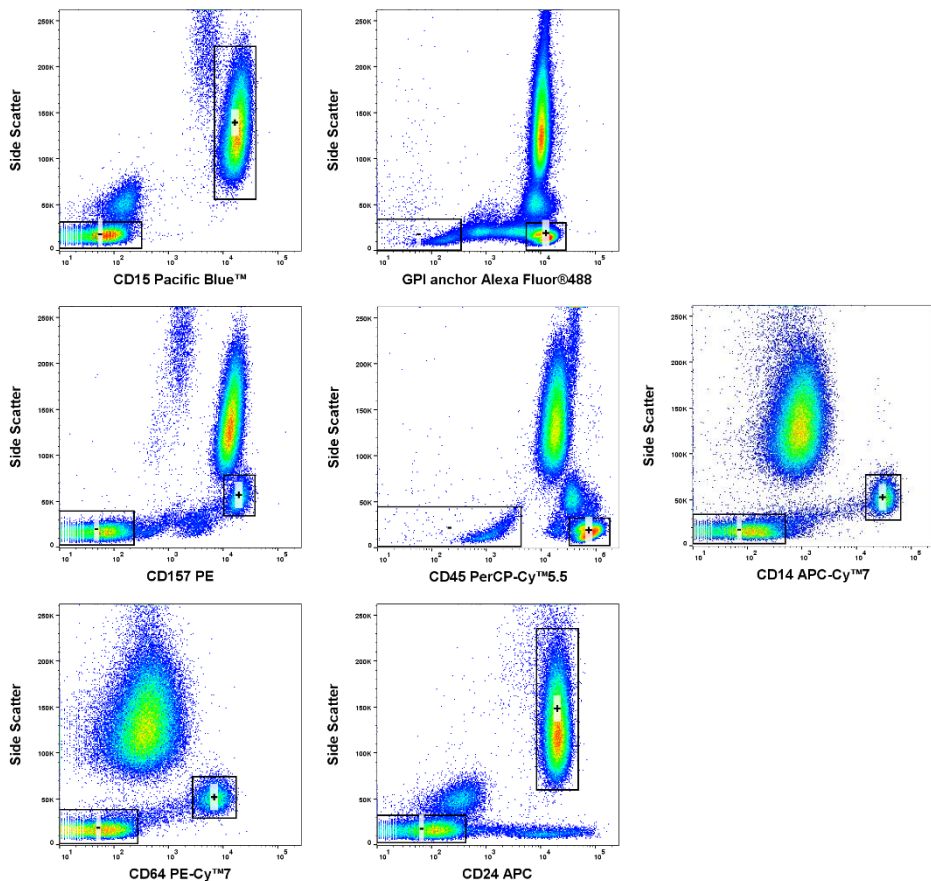
Figura 1 Identificação de partículas de compensação positivas (+) e negativas (-) da citometria nos tubos de compensação (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Análise de tubos de compensação PNH WBC 7-color (faixa ciano)

Visualize os dados não compensados de cada tubo de compensação numa dispersão lateral (SSC) versus um diagrama de pontos de “fluorocromo a ser compensado”. Defina os limites para as populações mais positivas (+) e mais negativas (-) conforme representado na Figura 2.

Figura 2 Identificação dos eventos mais positivos (+) e mais negativos (-) nos tubos de compensação (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Tubo PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

Devido à baixa contagem de iRBC na amostra de sangue diluído, é necessário adquirir um mínimo de 500.000 eventos eritrocitários para análise. A aquisição de $\geq 500\,000$ eventos resulta em tempos de aquisição mais longos. Isto poderá afetar o equilíbrio complexo da vinculação anticorpos-antígenos e a diminuição da fluorescência CD235a FITC. Monitorize sempre a estabilidade da intensidade da fluorescência ao longo do tempo de aquisição (Figura 3).

Figura 3 Todos os eventos adquiridos num diagrama de pontos CD235a FITC vs. Tempo (dados adquiridos no BD FACSLytic™).

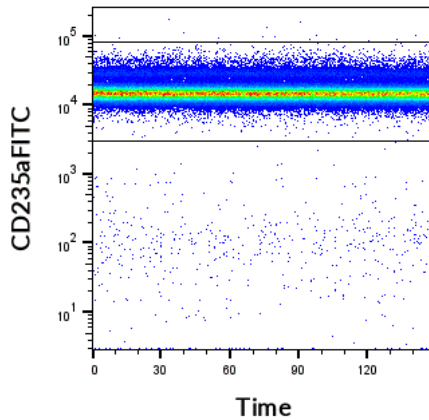
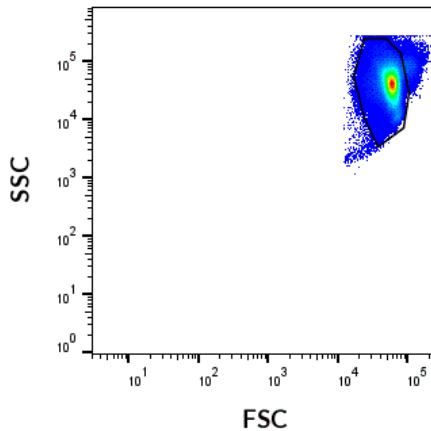
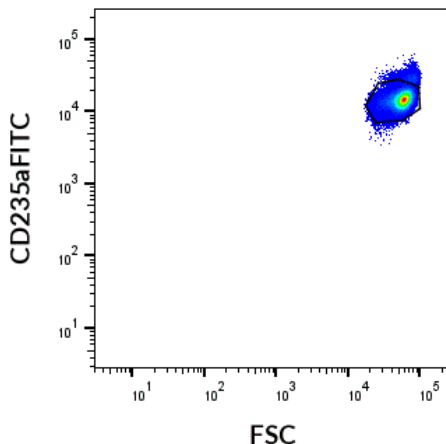


Figura 3a Apresentar todos os eventos do gate Tempo num diagrama de dispersão FSC-A vs. SSC-A em modo logarítmico (dados adquiridos no BD FACSLytic™).



Visualizar os dados compensados do gate SSC vs. FSC num diagrama de dispersão em modo logarítmico, em que o eixo X representa FSC e o eixo Y representa a intensidade de fluorescência no canal FITC. Definir o gate "singlets de hemácias CD235a+" (Figura 4).

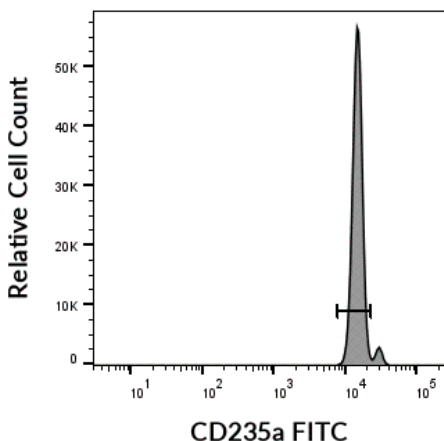
Figura 4 Delineação de singlets de hemácias CD235a+ (dados adquiridos no BD FACSLytic™).



Opcional:

Para uma melhor diferenciação dos singlets, é possível visualizar os dados compensados como um histograma, em que o eixo X representa a intensidade da fluorescência no canal FITC. Definir o gate "singlets de hemácias CD235a+" (Figura 4a).

Figura 4a Delineação dos singlets de hemácias CD235a+ (dados adquiridos no BD FACSLytic™).



Eritrócitos

Visualizar os singlets de hemácias CD235a+ num diagrama de dispersão CD59 PE versus FITC CD235a. Separar os eventos em três populações utilizando três gates adequados (Figura 5a, 5b) e calcular a percentagem de eventos nas regiões de Tipo I, Tipo II e Tipo III. Para um melhor ajuste das regiões entre o Tipo II e III em algumas situações, pode ser útil um histograma.

Figura 5a Paciente com clone de HPN: A) Singlets de hemácias CD235a+ num diagrama de dispersão CD59 PE vs. FITC CD235a; B) Singlets de hemácias CD235a+ num CD59 PE vs. histograma (dados adquiridos em BD FACSLytic™).

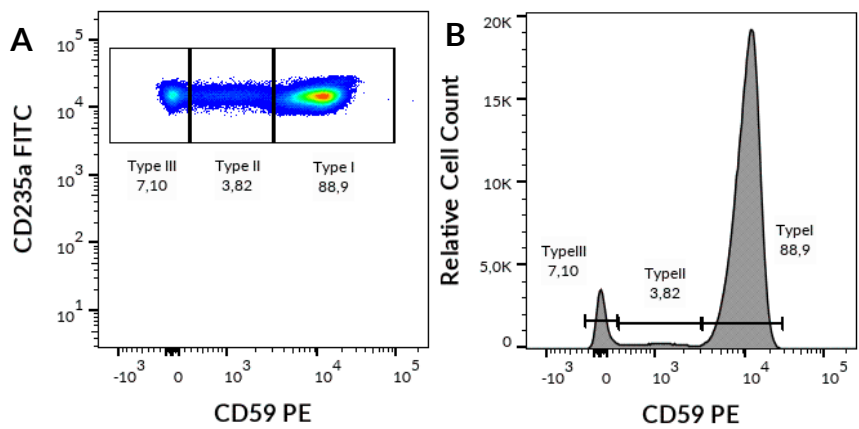
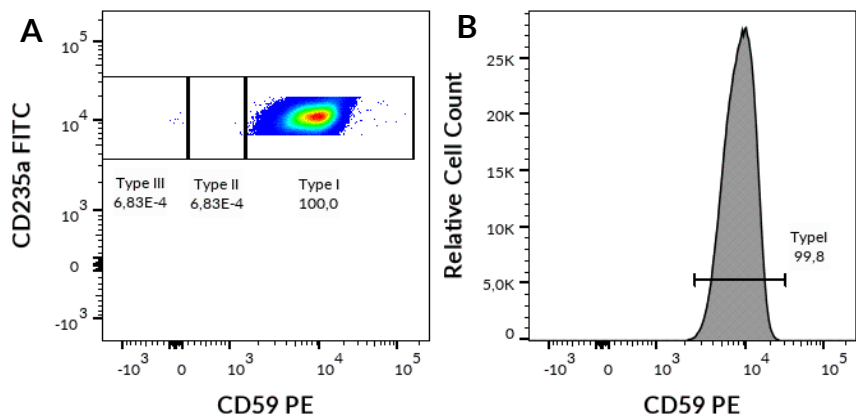


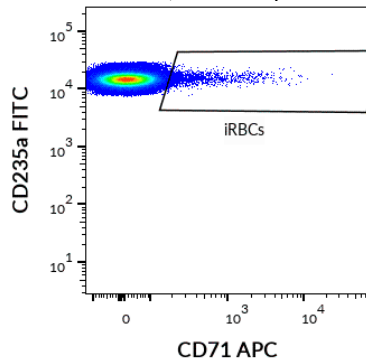
Figura 5b Dador saudável: A) Singlets de hemácias CD235a+ num diagrama de dispersão CD59 PE vs. FITC CD235a; B) Singlets de hemácias CD235a+ num CD59 PE vs. histograma (dados adquiridos com BD FACSLytic™).



iRBCs (reticulócitos imaturos)

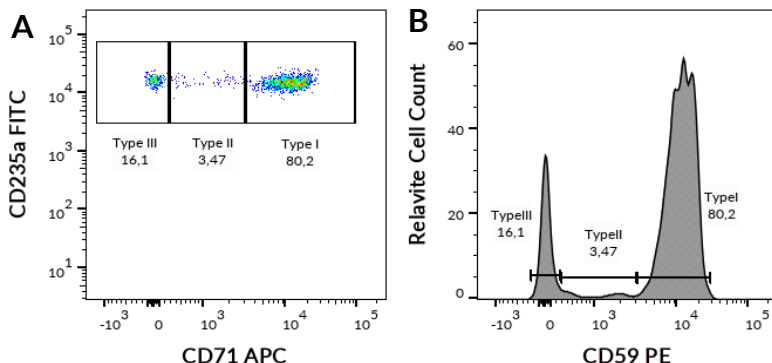
Em pacientes que recebem transfusões de sangue, pode ser difícil determinar a verdadeira percentagem de hemácias de HPN tipo II e III. Os glóbulos vermelhos saudáveis de um dador de sangue que circulam na corrente sanguínea do paciente com HPN têm impacto na percentagem exata do tamanho do clone de HPN. A adição de CD71 pode ser útil para excluir as células transfundidas do dador ⁽⁶⁾. Visualizar os singlets de hemácias CD235a+ num -diagrama de dispersão CD71 APC versus FITC CD235a e separar os iRBCs CD71+ (Figura 6).

Figura 6 Singletos CD235a+ RBC num diagrama de pontos CD71 APC vs. CD235a FITC. Delineamento dos iRBCs CD71+ (dados adquiridos no BD FACSLyric™).



Visualizar os iRBCs CD71+ num diagrama de dispersão CD59 PE versus FITC CD235a e num histograma CD59 PE vs. histograma (Figura 7). Separar os eventos em três populações utilizando três gates adequados e calcular a percentagem de eventos nas regiões de Tipo I, Tipo II e Tipo III.

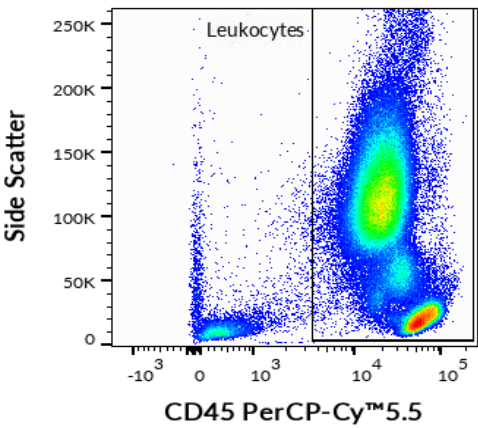
Figura 7 Paciente com clone de HPN, mas sem transfusão: A) iRBCs CD71+ num diagrama de dispersão CD59 PE vs. FITC CD235a; B) iRBCs CD71+ num CD59 PE vs. histograma (dados adquiridos em BD FACSLyric™).



Tubo PNH WBC 7-color (faixa ciano)

Adquirir pelo menos 50.000 neutrófilos e 10.000 monócitos, o que significa que são adquiridos pelo menos 200.000 eventos para análise. Visualize os dados compensados num diagrama de pontos de dispersão lateral versus intensidade de fluorescência em PerCP-Cy™ 5.5. Delimite os leucócitos CD45+ como indicado na Figura 8.

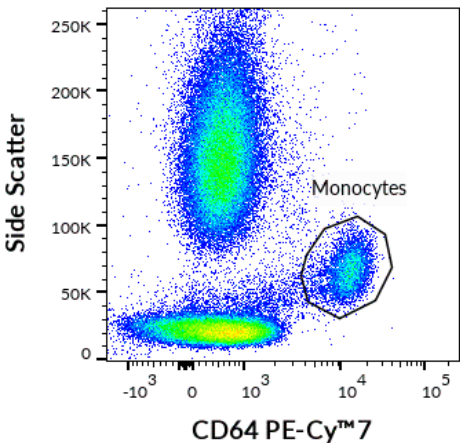
Figura 8 Delineamento de leucócitos CD45+ (dados adquiridos no BD FACSLytic™).



Monócitos

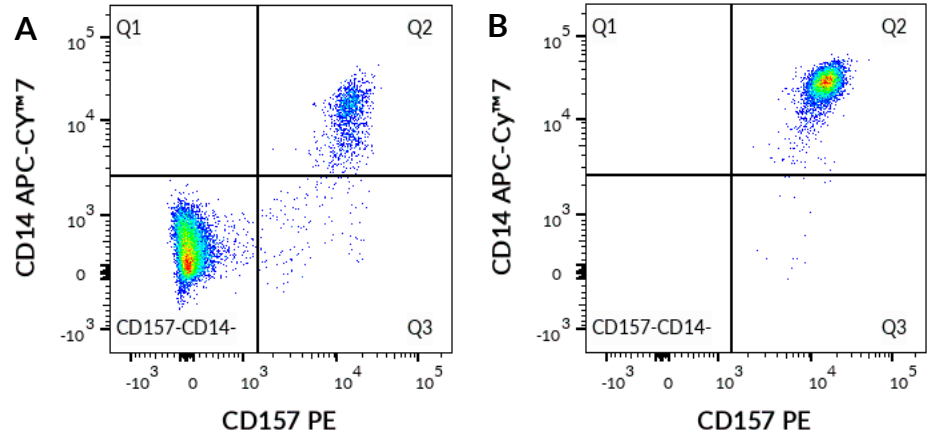
Visualize os leucócitos CD45+ num diagrama de pontos de dispersão lateral versus CD64 PE-Cy™7 e delimite os monócitos CD64+ conforme representado na Figura 9.

Figura 9 Delineamento de monócitos CD64+ a partir de leucócitos (dados adquiridos no BD FACSLytic™).



Visualize os monócitos CD64+ num diagrama de pontos CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (Figura 10). Defina os limites aproximados e calcule a percentagem da população CD157-CD14-.

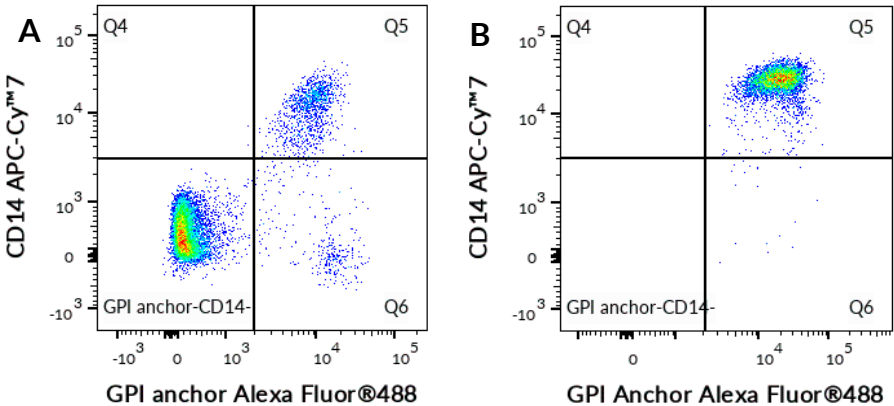
Figura 10 Monócitos CD64+ num diagrama de pontos CD157 PE vs. CD14 APC-Cy™7 (dados adquiridos no BD FACSLyric™). A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Depois, visualize os mesmos monócitos CD64+ num diagrama de dispersão com âncora GPI Alexa Fluor® 488 (Proaerolisina) versus CD14 APC-Cy™7 (Figura 11). Defina os limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora GPI-CD14-.

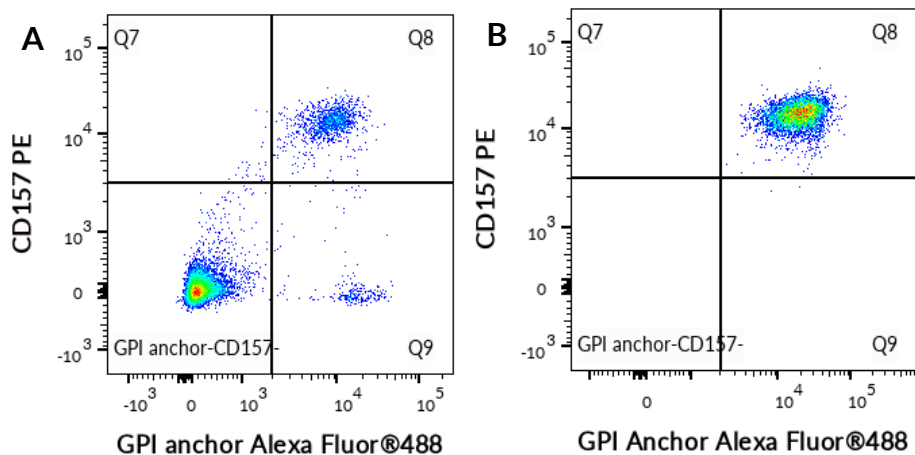
Figura 11 Monócitos CD64+ num diagrama de pontos com âncora de GPI Alexa Fluor® 488 vs. CD14 APC-Cy™7 (dados adquiridos no BD FACSLyric™).

A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Depois, visualize os mesmos monócitos CD64+ num diagrama de dispersão com âncora GPI Alexa Fluor® 488 (Proaerolisina) versus CD157 PE (Figura 12). Defina os limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora GPI-CD157-.

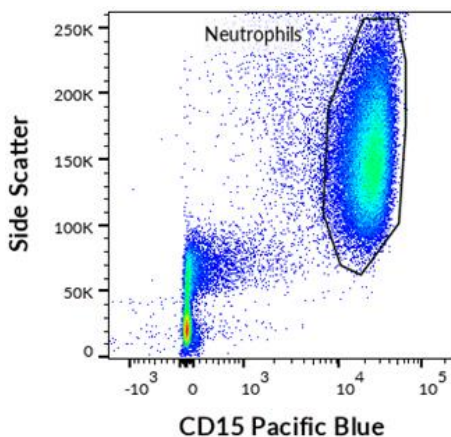
Figura 12 Monócitos CD64+ num diagrama de pontos com âncora de GPI Alexa Fluor® 488 vs. CD157 PE (dados adquiridos no BD FACSLytic™). A) paciente com clone PNH; B) dador saudável.



Neutrófilos

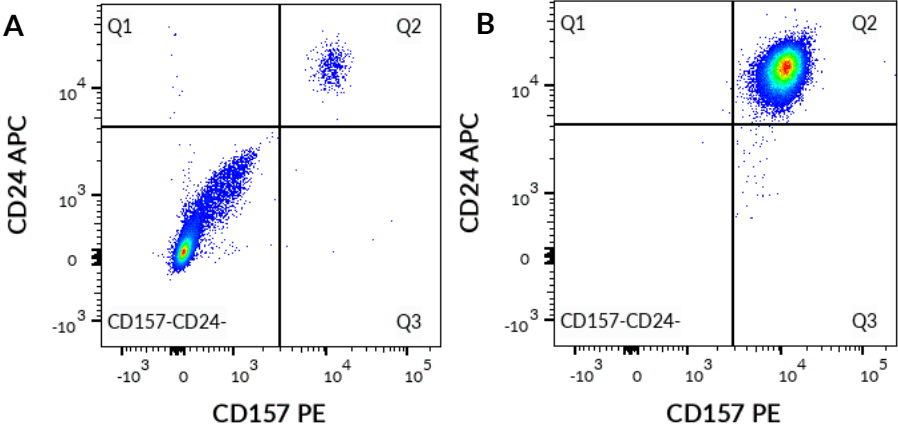
Visualize leucócitos CD45+ num diagrama de pontos de dispersão lateral versus CD15 Pacific Blue™ e separe os neutrófilos CD15+ conforme representado na Figura 13.

Figura 13 Delineamento de neutrófilos CD15+ a partir de leucócitos (dados adquiridos no BD FACSLytic™).



Visualize neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos CD157 PE versus CD24 APC conforme representado na Figura 14. Definir os gates adequados e calcular a percentagem da população CD157-CD24-.

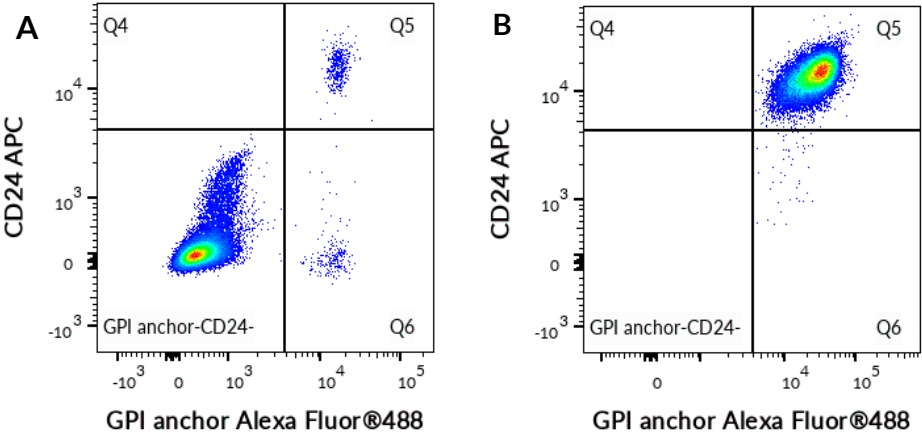
Figura 14 Neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos CD157 PE vs. CD24 APC (dados adquiridos no BD FACSLytic™). A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Depois, visualize os mesmos neutrófilos CD15+ num diagrama de dispersão com âncora GPI Alexa Fluor® 488 (Proaerolisina) versus CD24 APC, defina limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora GPI- CD24- conforme representado na Figura 15.

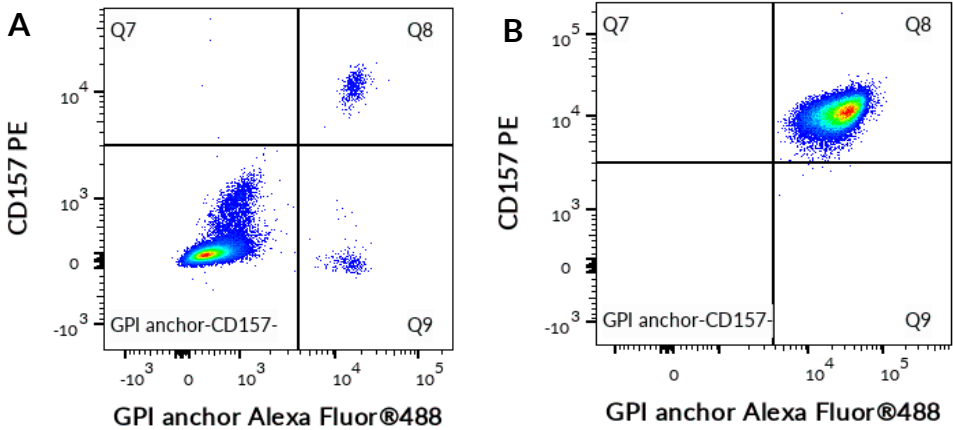
Figura 15 Neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos com âncora de GPI Alexa Fluor® 488 vs. CD24 APC (dados adquiridos no BD FACSLytic™).

A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Depois, visualize os mesmos neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos âncora de GPI Alexa Fluor® 488 (Proaerolisina) versus CD157 PE. Defina limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora de GPI- CD157- conforme representado na Figura 16.

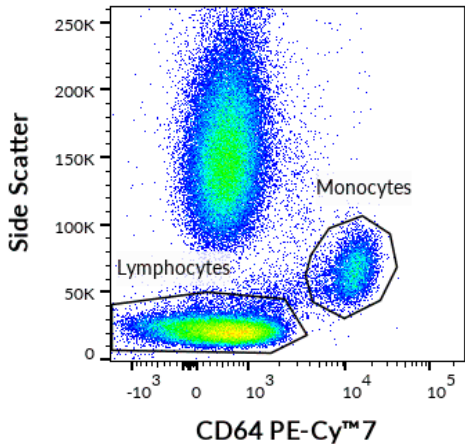
Figura 16 Neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos âncora de GPI Alexa Fluor® 488 vs. CD157 PE (dados adquiridos no BD FACSLytic™).
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Controlo interno

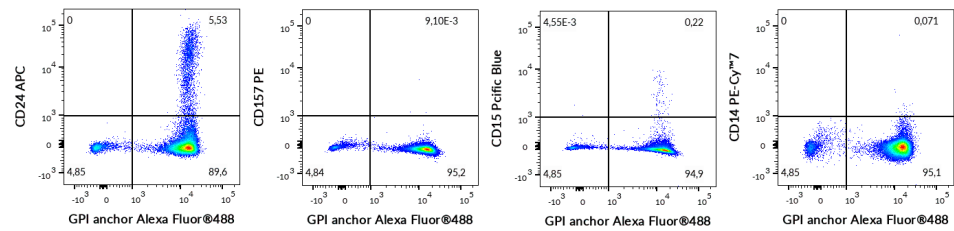
Para verificar a tensão e a compensação do detetor de fluorescência, é necessário verificar o controlo interno (Figura 18). No CD64 PE-Cy™7 versus gráfico de dispersão lateral, os linfócitos do gate são a população de controlo interno (Figura 17).

Figure 17 Delineação de linfócitos CD64- a partir de leucócitos (dados adquiridos com BD FACSLytic™).



Em seguida, visualizar os linfócitos em diagramas de dispersão ancorados em GPI com Alexa Fluor® 488 (Proaerolisina) versus CD24 APC/CD157 PE/CD15 Pacific Blue™/CD14 PE-Cy™7 para verificação das definições de tensão, compensação e desempenho do anticorpo (Figura 18).

Figura 18 Controlos internos (dados adquiridos no BD FACSLytic™).



Cálculo e interpretação de resultados analíticos

Enumere a percentagem de células com deficiência de GPI (tendo fenótipo PNH), consulte a Tabela 5.

Tabela 5 Fenótipos de clone PNH

População de células-mãe		Fenótipo PNH de acordo com a estratégia de limitação
Tubo PNH RBC 3-color	Eritrócitos (Tipo III)	CD59- CD235a+ (Fig. 5)
	Eritrócitos (Tipo II)	CD59 dim CD235a+ (Fig. 5)
	iRBCs (Tipo III)	CD59- CD235a+CD71+(Fig. 7)
	iRBCs (Tipo II)	CD59 dim CD235a+CD71+(Fig. 7)
Tubo PNH WBC 7-color	Monócitos	CD14- CD157- CD64+ (Fig. 10)
		CD14- âncora GPI- CD64+ (Fig. 11)
		CD157- âncora GPI - CD64+ (Fig. 12)
	Neutrófilos	CD24- CD157- CD15+ (Fig. 14)
		CD24- âncora GPI - CD15+ (Fig. 15)
		CD157- âncora GPI- CD15+ (Fig. 16)

Tabela 6 Interpretação dos resultados

Limite de detecção (LD) para os tubos WBC e RBC reportado como frequência do principal (%), calculado a partir de 100 medições de n=25 amostras normais de pacientes em n=4 diferentes plataformas de citômetro.				
Fenótipo PNH	Citômetro			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
Tubo PNH RBC 3-color				
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	0.005	0.002	0.029	0.049
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	0.240	0.320	0.388	0.562
Tubo PNH WBC 7-color				
Monócitos CD157- CD14-	0.20	0.19	0.14	0.30
Monócitos CD14- âncora GPI-	0.08	0.04	0.10	0.17
Monócitos CD157- âncora GPI-	0.07	0.06	0.04	0.03
CD157- CD24- Neutrófilos	0.02	0.02	0.06	0.03
Neutrófilos CD24- âncora GPI-	0.03	0.03	0.02	0.02
Neutrófilos CD157- âncora GPI-	0.01	0.01	0.01	0.01

Regras do algoritmo do relatório de deficiências de GPI ⁽⁶⁾:

1. Relatar um clone de HPN no tubo de hemácias

População celular	Frequência	Declaração e ação resultantes ⁽⁶⁾
Hemácias de tipo I + tipo II CD59-	< LD	"Não foram detetadas células HPN" Células de fenótipo HPN raras registadas abaixo do nível de deteção
	> 1 %	"Clone de HPN presente" Pode ser relatada a percentagem de células
	> LD (Quadro 6) < 0,01 % ⁽⁶⁾	"Células HPN presentes" Células de fenótipo HPN raras registadas abaixo do nível de quantificação

2. Relatar um clone de HPN no tubo de leucócitos

População celular	Frequência (%)	Declaração e ação resultantes ⁽⁶⁾
Monócitos CD14-ancorados em GPI	< LD	"Não foram detetadas células HPN" Células de fenótipo HPN raras registadas abaixo do nível de deteção
	> 1 %	"Clone de HPN presente" Pode ser relatada a percentagem de células
	> LD (quadro 6); < LIQ (quadros 13 e 14)	"Células HPN presentes" Pode ser relatada a percentagem de células
Neutrófilos CD24-ancorados em GPI	< LD	"Não foram detetadas células HPN" Células de fenótipo HPN raras registadas abaixo do nível de deteção
	> 1 %	"Clone de HPN presente" Pode ser relatada a percentagem de células
	> LD (quadro 6); < LIQ (quadros 13 e 14)	"Células HPN presentes" Pode ser relatada a percentagem de células

3. Indicar o tamanho do clone de HPN nas hemácias.

Indicar o tamanho total dos clones de HPN, bem como as percentagens da população de HPN de tipo II e de tipo III, juntamente com a contagem da população de células obtida de acordo com o Quadro 7.

4. Indicar o tamanho do clone de HPN nos leucócitos.

Indicar o tamanho do clone de HPN em ambas as linhagens – neutrófilos e monócitos. Os clones de HPN em leucócitos aparecem agrupados e menos dispersos do que os eventos aleatórios duplamente negativos. Os monócitos podem apresentar clones de HPN de maiores dimensões do que os neutrófilos ⁽²⁾.

A deficiência de GPI (presença de clone de HPN) deve ser expressa em todos os fenótipos de HPN dentro de um determinado subconjunto de leucócitos. Espera-se que todos os fenótipos de HPN de monócitos (Quadro 5) corem as células deficientes em GPI de forma semelhante ⁽⁶⁾. O mesmo se aplica aos fenótipos de HPN dos neutrófilos.

Terminologia do relatório de clones de HPN (de acordo com CLSI H52-A2):

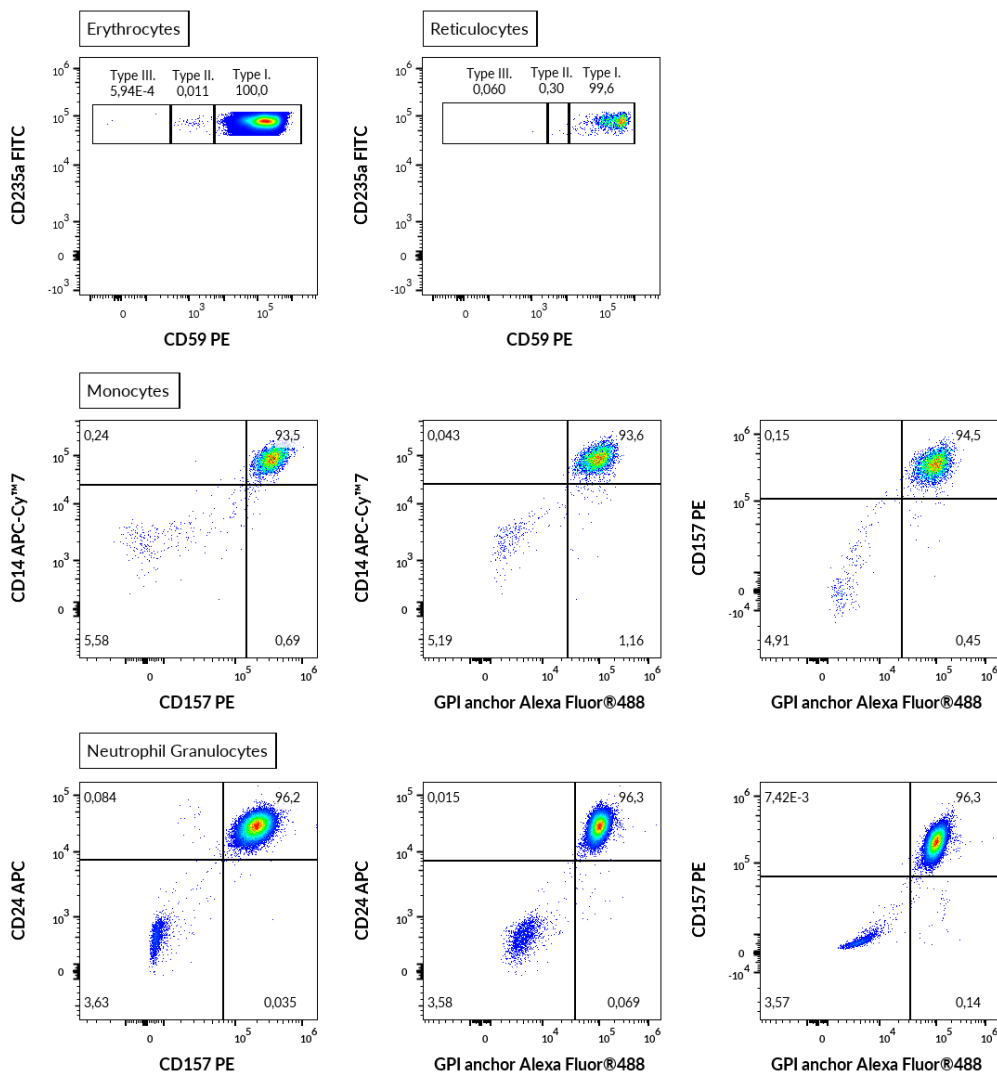
- a. População de HPN >1%: "clone de HPN"
- b. População de HPN entre 0,1% e 1%: "clone menor de HPN"
- c. População de HPN <0,1%: "células raras com fenótipo de HPN"

Tabela 7 Exemplos de possíveis resultados de exames (não de um único paciente) para um citômetro de fluxo BD FACLyric™.

Fenótipo de HPN	Contagem de eventos de HPN	Contagem de eventos da população parental	Frequência	LIQ	Avaliação
Hemácias CD59-CD235a	3 eventos	521.023 singlets de hemácias	0,0006%	0,01 % ⁽⁶⁾	"Não foram detetadas células HPN" Células de fenótipo HPN raras registadas abaixo do nível de deteção
CD24-âncora GPI-CD15+	69.851 eventos	75.849 neutrófilos	92,1 %	0,088 % (Tabela 13)	"Clone de HPN detetado" 92,1% tamanho do clone de HPN dos neutrófilos
CD14-âncora GPI-CD64+	13 eventos	12.497 monócitos	0,103%	0,141% (Tabela 13)	"Células HPN presentes; clone HPN menor" 0,103% tamanho do clone de PNH de monócitos

5. Os histogramas e os diagramas de dispersão podem ser incluídos opcionalmente no relatório.

Figura 19 Exemplo de um caso com presença de um clone PNH num tubo WBC, embora não seja detetado num tubo RBC (dados adquiridos no Beckman Coulter DxFLEx).



11.Desempenho analítico

Especificidade

A Proaerolisina Alexa Fluor® 488 é uma variante com rótulo fluorescente da aerolisina bacteriana que se vincula especificamente a âncoras GPI de proteínas da membrana de superfície das células humanas ^(1, 2, 5, 8).

O anticorpo SY11B5 reconhece um epítopo extracelular no antígeno CD157 da proteína CD157 expresso principalmente em monócitos e granulócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshop HLDA X).

O anticorpo 2D1 reconhece todas as isoformas de leucócitos do CD45 humano (Antígeno Comum de Leucócitos). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshop HLDA III).

O anticorpo 10.1 reconhece o antígeno CD64 humano, que é expresso nos monócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelos workshops HLDA (HLDA III: Workshop WS Code M-250).

O anticorpo SN3 reage com o antígeno CD24, expresso pelos granulócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (HLDA IV: WS Code B 136; HLDA V: WS Code B CD24.7)

O anticorpo MEM-15 reage com CD14, uma glicoproteína de membrana extracelular ligada ao GPI (glicofosfatidilinositol) expressa nos monócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshops 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).

O anticorpo MEM-158 reage com o CD15, com forte expressão na superfície dos granulócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshop HLDA VI: WS Code AS A053).

O anticorpo JC159 reconhece um epítopo da porção extracelular do CD235a (glicoforina A), uma sialoglicoproteína expressa nos eritoblastos precoces, eritoblastos posteriores, eritoblastos e eritrócitos maduros.

O anticorpo MEM-43 reage com o epítopo bem definido no CD59 (Protectin), glicoproteína ancorada no GPI e expressa na superfície de todas as células hematopoiéticas. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (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).

O anticorpo MEM-75 reage com um epítopo extracelular do antígeno CD71 expresso nos iRBCs imaturos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (HLDA IV: WS Code A 45; HLDA V: WS Code T T-165).

Precisão

A exatidão do método foi avaliada comparando o DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit com o método interno de um laboratório clínico acreditado (um cocktail de anticorpos conjugados de cor única de diferentes fabricantes e analisados com BD FACSCanto™ II) através da coloração paralela de 13 pacientes com presença confirmada de fenótipo de HPN. Os parâmetros da análise de regressão linear são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 Análise de regressão linear para contagens relativas de populações de células deficientes em GPI em pacientes com presença confirmada de fenótipos de HPN. Comparação do dispositivo do DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit analisado através de BD FACSCanto™ II com um método interno de um laboratório clínico acreditado.

Fenótipo de HPN	n	Inclinação	Interceção	R ²	Variação [%]
Eritrócitos Tipo III CD59-CD235a+	13	0.99	-0.026	1.00	1.28 – 83.79
iRBCs Tipo III CD59-CD235a+	13	0.99	-0,384	1.00	5.97 – 97.78
Eritrócitos Tipo II CD59-CD235a+	13	1.00	-0,059	1.00	0.13 – 89.92
iRBCs Tipo II CD59-CD235a+	13	0.98	0.141	1.00	0.33 – 74.67
Monócitos CD157- âncora GPI- CD64+	13	1.00	0.060	1.00	2.07 – 99.95
Neutrófilos CD157- âncora GPI- CD15+	13	0.99	0.294	1.00	0.80 – 99.82
Monócitos CD14- âncora GPI- CD64+	13	Não determinado			2.04 – 99.96
Monócitos CD14- CD157- CD64+	13	Não determinado			2.17 – 99.96
Neutrófilos CD24- CD157- CD15+	13	Não determinado			0.80 – 99.83
Neutrófilos CD24- âncora GPI- CD15+	13	Não determinado			0.81 – 99.80

n = número de amostras de sangue

Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi determinado para cada população-alvo (ver Tabela 5) como um valor médio dos resultados de 25 dadores de sangue saudáveis, aumentado pela adição de três desvios-padrão da média para 4 plataformas de citometria de fluxo diferentes (Tabelas 9, 10, 11 e 12).

Tabela 9 Valores LD do DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit para cada fenótipo de HPN adquiridos no citómetro de fluxo BD FACSLytic™.

Fenótipo PNH	BD FACSLytic™				
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	LD (Média + 3*SD)
Tubo de hemácias (1.000.000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos de glóbulos vermelhos isolados)*					
RBC Tipo II e Tipo III CD59-	25	0.003	0.001	5 – 48 eventos por 1 000 000 eventos	0.005 %
iRBCs Tipo II e Tipo III CD59-	25	0.054	0.061	0 – 5 eventos por 3 000 iRBCs	0.240 %
Tubo de leucócitos (50.000 neutrófilos e 10.000 monócitos adquiridos)					
Monócitos CD157-CD14-	25	0.076	0.041	2 – 24 eventos por 10 000 monócitos	0.20 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.021	0.018	0 – 5 eventos por 10 000 monócitos	0.08 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.014	0.020	0 – 4 eventos por 10 000 monócitos	0.07 %
Neutrófilos CD157-CD24-	25	0.006	0.006	0 – 10 eventos por 50 000 neutrófilos	0.02 %
Neutrófilos CD24-âncora GPI-	25	0.006	0.008	0 – 15 eventos por 50 000 neutrófilos	0.03 %
Neutrófilos CD157-âncora GPI-	25	0.002	0.002	0 – 4 eventos por 50 000 neutrófilos	0.01 %

AVISO*: aconselha-se um mínimo de 98% de eventos isolados para análise num cocktail de anticorpos líquido ⁽²⁴⁾. Um cocktail de anticorpos seco no DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay permite normalmente uma frequência mais baixa de eventos de singlet, e pode não ser atingida uma frequência de singlet de 98%.

Tabela 10 Valores LD do DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit para cada fenótipo de HPN adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

Fenótipo PNH	BD FACSCanto™ II				
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	LD (Média + 3*SD)
Tubo de hemácias (1.000.000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos de glóbulos vermelhos isolados)					
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	25	0.0006	0,0004	1 – 12 eventos por 1 000 000 eventos	0.002 %
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	25	0.0657	0.0847	0 – 5 eventos por 1 000 iRBCs	0.320 %
Tubo de leucócitos (50.000 neutrófilos e 10.000 monócitos adquiridos)					
Monócitos CD157-CD14-	25	0.085	0.035	2 – 16 eventos por 10 000 monócitos	0.19 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.086	0.096	0 – 3 eventos por 10 000 monócitos	0.04 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.084	0.019	0 – 7 eventos por 10 000 monócitos	0.06 %
Neutrófilos CD157-CD24-	25	0.004	0.052	0 – 5 eventos por 50 000 neutrófilos	0.02 %
Neutrófilos CD24-âncora GPI-	25	0.006	0.010	0 – 16 eventos por 50 000 neutrófilos	0.03 %
Neutrófilos CD157-âncora GPI-	25	0.002	0.002	0 – 4 eventos por 50 000 neutrófilos	0.01 %

Tabela 11 Valores LD do DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit para cada fenótipo de HPN adquiridos no citômetro de fluxo Beckman Coulter Navios EX.

Fenótipo PNH	Beckman Coulter Navios EX				
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	LD (Média + 3*SD)
Tubo de hemácias (1.000.000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos de glóbulos vermelhos isolados)					
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	25	0.007	0.007	4 – 236 eventos por 1 000 000 eventos	0.029 %
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	25	0.087	0.100	0 – 6 eventos por 1 000 iRBCs	0.388 %
Tubo de leucócitos (50.000 neutrófilos e 10.000 monócitos adquiridos)					
Monócitos CD157-CD14-	25	0.062	0.027	0 – 23 eventos por 10 000 monócitos	0.14 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.024	0.006	0 – 10 eventos por 10 000 monócitos	0.10 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.007	0.011	0 – 6 eventos por 10 000 monócitos	0.04 %
Neutrófilos CD157-CD24-	25	0.012	0.015	0 – 21 eventos por 50 000 neutrófilos	0.06 %
Neutrófilos CD24-âncora GPI-	25	0.005	0.005	0 – 6 eventos por 50 000 neutrófilos	0.02 %
Neutrófilos CD157-âncora GPI-	25	0.002	0.002	0 – 5 eventos por 50 000 neutrófilos	0.01 %

Tabela 12 Valores LD do DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit para cada fenótipo de PNH adquiridos no citômetro de fluxo Beckman Coulter DxFLEx.

Fenótipo PNH	Beckman Coulter DxFLEx				
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	LD (Média + 3*SD)
Tubo de hemácias (1.000.000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos de glóbulos vermelhos isolados)					
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	25	0,015	0.012	5 – 48 eventos por 1 000 000 eventos	0.049 %
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	25	0.106	0.152	0 – 5 eventos por 1 000 iRBCs	0.562 %
Tubo de leucócitos (50.000 neutrófilos e 10.000 monócitos adquiridos)					
Monócitos CD157-CD14-	25	0.092	0.068	0 – 27 eventos por 10 000 monócitos	0.30 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.053	0.040	0 – 16 eventos por 10 000 monócitos	0.17 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.005	0.009	0 – 1 eventos por 10 000 monócitos	0.03 %
Neutrófilos CD157-CD24-	25	0.010	0.008	0 – 14 eventos por 50 000 neutrófilos	0.03 %
Neutrófilos CD24-âncora GPI-	25	0.008	0.006	0 – 10 eventos por 50 000 neutrófilos	0.02 %
Neutrófilos CD157-âncora GPI-	25	0.002	0.002	0 – 3 eventos por 50 000 neutrófilos	0.01 %

Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi determinado por diluições em série (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) de uma amostra fresca de HPN com uma amostra fresca de sangue normal e avaliado por coloração e análise em triplicado utilizando os citômetros de fluxo BD FACSLytic™ e Beckman Coulter DxFlex. Foi selecionado um CV máximo de 10% como critério de sensibilidade para o LIQ.

Tabela 13 Valores de frequência LIQ do DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSLytic™.

Fenótipo de HPN	Diluição	N.º de células HPN	LIQ	CV
Hemácias CD59-Tipo II e Tipo III	1:10,000	101	0.029 %	3.9 %
Monócitos CD157- CD14-	1:10,000	28	0.677 %	2.3 %
Monócitos CD14- ancorados em GPI	1:10,000	7	0.130 %	7.7 %
Neutrófilos CD157- ancorados em GPI	1:10,000	2	0.018 %	9.9 %
Neutrófilos CD157- CD24-	1:10,000	3	0.012 %	3.6 %
Neutrófilos CD24- CD157- CD24-	1:10,000	1	0.009 %	8.7 %
Neutrófilos CD157- CD157- CD24-	1:10,000	1	0.010 %	1.2 %

Tabela 14 Valores de frequência LIQ do DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit adquiridos no citômetro de fluxo Beckman Coulter DxFLEx.

Fenótipo de HPN	Diluição	N.º de células HPN	LIQ	CV
Hemácias CD59-Tipo II e Tipo III	1:10,000	101	0.005 %	9.1 %
Monócitos CD157- CD14-	1:10,000	22	0.143 %	4.0 %
Monócitos CD14- ancorados em GPI	1:10,000	4	0.026 %	2.2 %
Monócitos CD157- ancorados em GPI	1:10,000	11	0.068 %	5.9 %
Neutrófilos CD157- CD24-	1:10,000	29	0.024 %	4.2 %
Neutrófilos CD24- ancorados em GPI	1:10,000	8	0.007 %	7.1 %
Neutrófilos CD157- ancorados em GPI	1:10,000	9	0.007 %	8.5 %

AVISO: Para análise de citometria de fluxo foram utilizados os seguintes citômetros de fluxo, incluindo a versão do software:

BD FACSCanto™ II	BD FACSDiva Software – versão 8.0.2
BD FACSLyric™	BD FACSuite™ Software – versão v1.5.0.925
Beckman Coulter DxFLEX	CytExpert for DxFLEX – versão 2.0.2.18
Beckman Coulter Navios EX	Navios EX Software – versão 2.2

Para avaliação dos dados medidos foi utilizada a seguinte plataforma de análise: FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - versão 10.9.0

12.Desempenho clínico

Pacientes com deficiência GPI

Foram recolhidos dados clínicos de um estabelecimento clínico de 19 pacientes, tanto saudáveis ⁽⁶⁾ como com deficiência GPI confirmada ⁽¹³⁾. O desempenho clínico foi determinado por comparação do dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit com um método interno de um laboratório clínico acreditado (um cocktail de anticorpos conjugados de cor única de diferentes fabricantes e analisado com recurso a BD FACSCanto™ II).

A deficiência GPI nos pacientes foi avaliada em relação ao método usado (Tabela 15) por deteção de células com deficiência GPI (clones PNH).

Tabela 15 Desempenho clínico do dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Avaliação da deficiência GPI usando um método interno de um laboratório clínico acreditado	
		Deficiência GPI	Condição normal
Avaliação da deficiência GPI usando o dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Deficiência GPI	13 pacientes	0 pacientes
	Condição normal	0 pacientes	6 pacientes

13.Valores esperados

Intervalo de Referência

Na população normal não é detetada qualquer deficiência de GPI e espera-se que todos os valores percentuais do fenótipo da HPN sejam inferiores ao valor de Assay Cut-off (LOD) ⁽⁶⁾.

14.Limites

Não foram identificadas limitações à utilização em tipos específicos de doenças, como as anemias.

A comunicação de deficiências de GPI é limitada, de acordo com as atuais diretrizes publicadas ⁽⁶⁾.

O clone de HPN não é detetado em linfócitos porque ocorre mais frequentemente em neutrófilos e monócitos do que em linfócitos maduros, o que sugere que as células linfóides têm uma vida longa e podem existir antes da formação ou expansão de clones de HPN.

15.Referências

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

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

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

16. Resumo da segurança e do desempenho

O resumo da segurança e do desempenho estará disponível na base de dados Eudamed em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Até lá, o resumo da segurança e do desempenho está disponível mediante pedido.

17. Utilização de Marcas Registradas de Terceiros

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™ e FlowJo™ são marcas registradas da Becton, Dickinson and Company. Cy™ e CyDye™ é uma marca registrada Cytiva. VenturiOne® é uma marca registrada da Applied Cytometry. Infinicyt™ é uma marca registrada da Cytognos S.L. SPHERO™ COMPTrol é uma marca registrada da Spherotech, Inc.

18. Histórico de revisões

Versão 4, ED7750_IFU_v4

- 1) O capítulo "Espécime" foi atualizado.
- 2) As precauções no Capítulo 10 foram atualizadas.
- 3) As secções "Tubo de hemácias HPN de 3- cores" e "Tubo de leucócitos HPN de

- 7- cores", incluindo as figuras no capítulo 10, foram atualizadas.
- 4) Foi acrescentada a secção "Controlos internos" no capítulo 10.
- 5) Foi acrescentada uma advertência na secção "Cálculo e interpretação dos resultados analíticos".
- 6) A secção "Regras do algoritmo do relatório de deficiências de GPI" foi atualizada.
- 7) A secção 11 "Desempenho analítico" foi atualizada.
- 8) A secção "Limitações" foi atualizada.
- 9) A numeração dos artigos da secção "Referências" foi corrigida.

19.Fabricante

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

Informação de contacto

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

20.Representantes autorizados

N/A

AVISO: Qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade local competente.