

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit 25 pruebas | Cat. N° ED7750



Instrucciones de uso (ES)

Versión: ED7750_IFU_v2_ES

Fecha de emisión: 25-10-2024

Símbolos utilizados en el etiquetado del dispositivo

	Producto sanitario para diagnóstico IN VITRO		Límite de temperatura
	Marca CE Número de ID del organismo notificado		Mantener apartado de la luz del sol
	Fabricante		Mantener seco Mantener alejado de la lluvia
	Identificador único de dispositivo		Precaución
	Consulte las instrucciones de uso		No reutilizar
	Contiene suficientes para <n> pruebas		Contiene <n> tubos para pruebas de un solo uso
	Número de catálogo		Solución concentrada (10x)
	Código de lote		Contenido
	Fecha de caducidad		Marca UKCA

1. Objetivo previsto

El kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay está diseñado para la detección y recuento de alta sensibilidad de las células con deficiencia de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en sangre humana total mediante citometría de flujo.

Qué se detecta y/o mide

El kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay detecta y recuenta las células con deficiencia de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (clones de HPN) como porcentaje de:

- Células CD59 dim o CD59- de todos los eritrocitos (CD235a+)
- Células CD59 dim o CD59- de todos los iRBCs (CD235a+CD71+)
- Células CD14-, CD157- y con anclaje GPI de todos los monocitos (CD45+CD64+)
- Células CD24-, CD157- y con anclaje GPI de todos los granulocitos neutrófilos (CD45+CD15+)

Función del dispositivo

El dispositivo está destinado al diagnóstico y seguimiento de pacientes que padecen, o se sospecha que padecen, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y trastornos relacionados ⁽¹⁾.

Contexto de un estado fisiológico o patológico

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno poco frecuente de las células madre hematopoyéticas que resulta como consecuencia de la expansión clonal no maligna de células con una mutación somática del gen PIG-A (fosfatidilinositol glicano de clase A). Las mutaciones del gen PIG-A provocan la incapacidad de expresar proteínas de la superficie celular con anclajes GPI (glicosilfosfatidilinositol).

El dispositivo está destinado a detectar granulocitos neutrófilos y monocitos con deficiencia de GPI ⁽¹⁾, junto con eritrocitos deficientes en GPI completos (Tipo III) y parciales (Tipo II) ^(2,3,4,5,6) para la evaluación del tamaño del clon de HPN.

Además, el dispositivo detecta iRBCs deficientes en GPI (eritrocitos inmaduros) en pacientes que reciben transfusiones de sangre cuando es difícil delimitar los eritrocitos de la HPN ⁽⁷⁾.

Tipo de ensayo

No automatizado

Cuantitativo

Tipo de muestra requerida

Muestra de sangre total periférica humana anticoagulada (EDTA, heparina, citrato) ⁽¹⁾

Población sometida a pruebas

Pacientes con:

- marcadores de laboratorio de hemólisis, cuando se han excluido otras causas más comunes de hemólisis,
- trombosis inexplicables en edad temprana,
- trombosis diagnosticada en zonas poco usuales,
- anemia aplásica (AA) hereditaria o adquirida,
- síndrome mielodisplásico (SMD),
- citopenia inexplicable en la que la AA o el SMD son consideraciones diagnósticas diferenciales ⁽¹⁾

2. Usuario previsto

El aparato está destinado exclusivamente a un uso profesional en laboratorio. No para pruebas cercanas al paciente o autodiagnóstico.

Requisitos de cualificación

El usuario previsto deberá poseer los conocimientos más avanzados en análisis de citometría de flujo de células humanas, técnicas de laboratorio estándar, incluidas habilidades de pipeteo, y manipulación segura y adecuada de muestras derivadas del cuerpo humano.

El usuario previsto deberá cumplir la norma EN ISO 15189 u otras disposiciones nacionales, en su caso.

3. Principio de prueba

El principio de la prueba se basa en la detección del anclaje GPI y de las proteínas con anclajes GPI en la superficie de las células sanguíneas humanas. Los anticuerpos monoclonales y la proaerolisina recombinante utilizados en la prueba están marcados con diferentes fluorocromos excitados por el haz láser de un citómetro de flujo, durante la adquisición de una muestra de sangre tintada. Posteriormente, el instrumento recoge y analiza la fluorescencia (emisión de luz) de cada fluorocromo presente en una célula sanguínea adquirida. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la densidad de expresión del antígeno en una célula, lo que permite separar diferentes subconjuntos celulares.

4. Reactivo(s) suministrado(s)

Contenido

El kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay, suficiente para el examen de 25 pacientes, se suministra con los siguientes reactivos:

PNH High-Sensitivity Assay (25 bolsas). Cada bolsa consta de 1 tubo de un solo uso para **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) codificado por colores (tira cian) y 1 tubo de un solo uso para **PNH RBC 3-color** (ED7750-2) codificado por colores (tira roja)

y tapado, que contiene combinaciones premezcladas de reactivos marcados con fluorocromos seco con los ingredientes estabilizadores como una capa en el fondo de los tubos de ensayo (12 × 75 mm), véase las Tablas 1 y 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 frasco) que contiene 15 ml de solución tampón concentrada (10X) a base de formaldehído.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 bolsa) que contiene 10 tubos de un solo uso tapados, cada uno de los cuales contiene un único reactivo marcado con fluorocromo seco con los ingredientes estabilizadores como capa en el fondo del tubo (12 × 75 mm).

PRECAUCIÓN: El juego de compensación de HPN está destinado únicamente a la configuración de la compensación. Los reactivos marcados con un solo fluorocromo (véase las Tablas 1 y 2) permiten un procedimiento de compensación fácil y preciso.

Composición

Tabla 1 Descripción de PNH WBC 7-color de los principios activos

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Isotipo
Anclaje GPI (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

Tabla 2 Descripción de PNH RBC 3-color de los principios activos

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Isotipo
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Materiales necesarios pero no proporcionados

Agua desionizada (de calidad reactiva)

Solución salina tamponada con fosfato (1X PBS), pH 7,2 – 7,4

Partículas de compensación para citometría de flujo (kit de Spherotech SPHERO™ COMPtrol, N.º de cat. CMIgP-50-3K o partículas de compensación equivalentes)

6. Equipamiento necesario

Pipeta automática con puntas desechables (100 µl – 5 ml) para pipetear muestras y reactivos

Dispensador de líquido o pipeta con puntas desechables (2 ml) para dispensar la solución de lisado eritrocitaria

Mezclador vórtex

Tubos de centrifuga cónicos de polipropileno (15 ml o 50 ml) para la preparación de muestras

Centrífuga con adaptadores de rotor adecuados para tubos de fondo redondo de 12 × 75 mm

Citómetro de flujo con tres fuentes de excitación láser (488 nm, ~635 nm y 405 nm), detectores de dispersión, filtros ópticos y detectores de emisión adecuados para recoger las señales de los fluorocromos que figuran en la Tabla 3

Tabla 3 Características espectrales de los fluorocromos utilizados en el dispositivo

Fluorocromo	Excitación [nm]	Emisión [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: El dispositivo se probó en los citómetros de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter) y DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Almacenamiento y manipulación

Almacenar a 20-30 °C.

Evitar la exposición prolongada a la luz.

Manténgalo seco.

PRECAUCIÓN: Producto sensible a la humedad. No abra la bolsa de aluminio hasta el primer uso.

Véase la sección 10 Procedimiento (Preparación de los reactivos suministrados) para obtener información sobre las condiciones de almacenamiento y la estabilidad de las soluciones de trabajo (cuando proceda).

8. Advertencias, precauciones y limitaciones de uso

Clasificación de peligrosidad del SGA

ADVERTENCIA: La solución lisante (ED7750-3) contiene formaldehído (CAS N° 50-00-0) and methanol (CAS N° 67-56-1) en concentraciones clasificadas como peligrosas.

Elementos de etiquetado	Palabra de señal
	Peligro
	
Frases H	H315: Provoca irritación cutánea. H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H319: Provoca irritación ocular grave. H335: Puede irritar las vías respiratorias. H341: Se sospecha que provoca defectos genéticos. H350: Puede provocar cáncer. H371: Puede provocar daños en los órganos. H373: Puede provocar daños en los riñones tras exposiciones prolongadas o repetidas en caso de ingestión. H302+H312+H332: Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación.
Frases P	P201: Pedir instrucciones especiales antes del uso. P260: No respirar los vapores. P264: Lavarse las manos y partes expuestas del cuerpo concienzudamente tras la manipulación. P280: Llevar guantes/gafas/máscara de protección.

P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal.
P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabones.
P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
P308+P313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.
P314: Consultar a un médico en caso de malestar.
P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364: Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Consulte la Ficha de Datos de Seguridad (FDS) disponible en la página del producto en www.exbio.cz para obtener toda la información sobre los riesgos que plantean las sustancias y mezclas químicas contenidas en el Producto y cómo deben manipularse y eliminarse.

Peligro biológico

Las muestras biológicas humanas y los especímenes sanguíneos, así como cualquier material que entre en contacto con ellos, se consideran siempre materiales infecciosos.

Utilizar equipo de protección personal y de seguridad para evitar el contacto con la piel, los ojos y las mucosas.

Siga todas las leyes, reglamentos y procedimientos aplicables para la manipulación y eliminación de materiales infecciosos.

Pruebas de deterioro

El aspecto normal del reactivo suministrado es una capa seca transparente en el fondo del tubo. No utilice el reactivo si observa algún cambio de aspecto, como, por ejemplo presencia de humedad en el interior del tubo.

Limitación de uso

No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del producto.

No reutilice los tubos de ensayo.

9. Muestra

Utilice sangre venosa periférica recogida en recipiente para muestras clasificado como dispositivo médico, con anticoagulante EDTA, heparina o ACD (ácido-citrato-dextrosa) ⁽²⁾.

Utilice únicamente muestras no tratadas. No utilice muestras prelisadas, lavadas o diluidas.

Procese la muestra de sangre antes de que transcurran 48 horas desde su extracción. Conserve la muestra a temperatura de laboratorio (entre 20 y 25 °C). No la refrigere.

Interferencias endógenas

En la Tabla 4 se identifican las fuentes de interferencia endógenas basándose en la investigación bibliográfica.

Tabla 4 Interferencias endógenas del aparato

Interferencias endógenas	Impacto	Referencia
Albúmina	La albúmina puede interferir en altas concentraciones debido a su capacidad para unirse y liberar grandes cantidades de ligandos.	9, 10, 26
Bilirrubina (ictericia) (no conjugado)	La bilirrubina aumenta el fondo de fluorescencia de las células debido a su elevada autofluorescencia.	13, 15, 19
Restos celulares (después de la lisis)	Los restos celulares pueden dar lugar a recuentos celulares inexactos y reducir los anticuerpos presentes en el dispositivo.	12, 16
Eritrocitos	Lisis insuficiente; los glóbulos rojos presentes en la muestra pueden dar lugar a un recuento celular erróneo.	17
Hemoglobina	Las muestras hemolizadas pueden generar resultados poco fiables.	14
Anticuerpos antimurinos humanos	Puede afectar a la funcionalidad del dispositivo (es decir, a su capacidad de unirse a antígenos de la superficie celular).	11, 21, 22, 23, 24, 25
Inmunoglobulinas	Puede afectar al recuento de subconjuntos de linfocitos.	12
Factores reumatoides	La presencia de RF interfiere con los MIA (inmunoensayos multiplex).	18
Triglicéridos	Los niveles circulantes elevados de lípidos pueden afectar al análisis por citometría de	20

	flujo de determinadas poblaciones de células sanguíneas.	
--	--	--

Interferencias exógenas

Según los trabajos publicados por Sutherland et. al.⁽⁷⁾, los hematíes procedentes de transfusiones de sangre son una interferencia importante en el análisis de la HPN en pacientes con un gran clon de HPN que experimentan hemólisis extravascular. Los eritrocitos sanos recibidos por transfusión afectan significativamente al seguimiento del clon de HPN en el linaje de los glóbulos rojos (GR). La adición de CD71 mejora significativamente la capacidad de analizar el tamaño de los clones de HPN en el linaje de los GR, independientemente del estado hemolítico y/o transfusional del paciente.

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit supera este problema de acuerdo con las directrices anteriormente mencionadas, ya que ofrece el antígeno CD71 para la identificación de glóbulos rojos inmaduros (GRi), que también expresan el antígeno CD59 anclado a GPI. En las bolsas de transfusión, los GRi suelen estar presentes en una cantidad muy baja ⁽²⁷⁾. Por otro lado, los pacientes que experimentan hemólisis extravascular causada por la HPN presentan un aumento del recuento de GRi debido a la rápida pérdida de eritrocitos ⁽²⁸⁾. Así, al añadir el anticuerpo monoclonal CD71 para identificar los GRi, el médico dispone de una monitorización más precisa del progreso de la HPN, que se notifica como pérdida del antígeno CD59 en los GRi, superando la interferencia de los GR exógenos de las bolsas de transfusión. DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit contiene anticuerpo anti-CD71 humano y permite el uso de las directrices más recientes para la detección y cuantificación de clones de HPN.

10.Procedimiento

Preparación de reactivo(s) suministrado(s)

PNH High-Sensitivity Assay

No es necesaria la preparación de reactivos, se suministra en tubos de ensayo de un solo uso.

Lysing Solution

El reactivo debe alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso.

El reactivo tiene una concentración 10X y debe diluirse con agua desionizada antes de usarlo (1 volumen de la solución concentrada y 9 volúmenes de agua desionizada). Tras la primera apertura, el reactivo conserva sus características de rendimiento hasta la fecha de caducidad si se conserva en las condiciones indicadas en su envase primario original.

La solución de lisado diluida (1X) es estable durante 1 mes si se conserva en un dispensador de líquidos o en un recipiente cerrado a temperatura ambiente.

Preparación de materiales necesarios pero no suministrados

Partículas de compensación

Prepare la solución de trabajo de las partículas de compensación de citometría de flujo según las instrucciones del fabricante.

Configuración de la compensación

Adquiera los tubos del juego de compensación utilizando la misma configuración del citómetro de flujo, antes del análisis de los tubos de PNH RBC 3-color y de PNH WBC 7-color.

PRECAUCIÓN: Los procedimientos de configuración de la compensación de PNH RBC 3-color y PNH WBC 7-color difieren en el tipo de preparación y tinción de la muestra.

Tubos de compensación de PNH RBC 3-color (tira roja)

1. Añada el kit de SPHERO™ COMPtrol o partículas de compensación equivalentes en el fondo de cada tubo de compensación monocolor.
2. Mezcle varias veces con un vórtex e incube durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
3. Añada 4 ml de PBS 1X a cada tubo de compensación. Centrifugue durante 5 minutos a 300×g.
4. Deseche el sobrenadante sin alterar las partículas de compensación y añada 0,1 ml de PBS 1X a cada tubo de compensación.
5. Ajuste la tensión de los detectores de fluorescencia de interés antes del análisis de la muestra tintada. La tensión de un detector PMT debe ajustarse lo suficientemente alta, para que el mínimo de eventos de tinción interfiera negativamente con el canal 0 en el eje de fluorescencia. Además, la tensión del detector PMT no debe superar los valores en los que los eventos positivos se presionan hacia el eje derecho.
6. Adquiera inmediatamente los tubos de compensación tintados utilizando el citómetro de flujo.
7. Calcule la matriz de compensación de PNH RBC 3-color en el software del citómetro desarrollado por el fabricante o en un software específico para el análisis de datos de citometría fuera de línea. Utilice esta matriz de compensación para todos los tubos de ensayo de este lote de glóbulos rojos de HPN de 3 colores.

PRECAUCIÓN: Una vez configurado para el lote específico de PNH RBC 3-color, no cambie la configuración de los detectores fluorescentes para conservar la misma configuración de obtención de la matriz de compensación y

los mismos resultados de compensación.

Tubos de compensación de PNH WBC 7-color (tira cian)

1. Añada 50 µl de agua desionizada en el fondo de cada tubo de compensación monocolor y agite enérgicamente durante 7 – 10 segundos.
2. Añada 100 µl de sangre total periférica a cada tubo de compensación monocolor y agite enérgicamente.
3. Incube durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
4. Añada 2 ml de solución de lisado diluida (1X) a cada tubo de compensación.
5. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
6. Centrifugue durante 5 minutos a 300×g, deseche el sobrenadante y resuspenda el sedimento celular en 2 ml de PBS 1X.
7. Centrifugue durante 5 minutos a 300×g, deseche el sobrenadante y resuspenda el sedimento celular en 0,2 ml de PBS 1X.
8. Ajuste la tensión de los detectores de fluorescencia de interés antes del análisis de la muestra tintada. La tensión de un detector PMT debe ajustarse lo suficientemente alta, para que el mínimo de eventos de tinción interfiera negativamente con el canal 0 en el eje de fluorescencia. Además, la tensión del detector PMT no debe superar los valores en los que los eventos positivos se presionan hacia el eje derecho.
9. Adquiera inmediatamente los tubos de compensación tintados utilizando el citómetro de flujo.
10. Calcule la matriz de compensación de PNH WBC 7-color en el software del citómetro desarrollado por el fabricante o en un software específico para el análisis de datos de citometría fuera de línea. Utilice esta matriz de compensación para todos los tubos de ensayo de este lote de PNH WBC 7-color.

PRECAUCIÓN: Una vez configurado para el lote específico de PNH WBC 7-color, no cambie la configuración de los detectores fluorescentes para conservar la misma configuración de obtención de la matriz de compensación y los mismos resultados de compensación.

Preparación de las muestras

La detección y diferenciación de clones de HPN en eritrocitos utilizando el tubo de PNH RBC 3-color requiere la preparación de la muestra antes del procedimiento de tinción.

AVISO: Antes de procesar la muestra, asegúrese de que el citómetro se ha configurado correctamente.

1. Etiquete un tubo cónico de polipropileno con la identificación de la muestra de sangre examinada.
2. Pipetee 10 µl de muestra de sangre bien mezclada al fondo del tubo cónico etiquetado.
3. Diluya la muestra de sangre 1:100 con 1 ml de PBS 1X y mezcle agitando a mano durante 5 segundos.

PRECAUCIÓN: La forma clásica de HPN está dominada por la hemólisis intravascular. Antes de diluir la muestra de sangre, consulte el recuento de glóbulos rojos del analizador hematológico para adquirir un recuento en la muestra de sangre diluida de entre 3 y 5×10^7 /ml de sangre diluida y ajuste el factor de dilución según sea necesario para adquirir un recuento suficiente de glóbulos rojos en el citómetro de flujo.

4. Continúe con el procedimiento de tinción de la muestra inmediatamente después de la dilución de esta.

La detección de células con deficiencia de GPI en granulocitos neutrófilos y monocitos utilizando un tubo de glóbulos blancos de PNH WBC 7-color no requiere la preparación de la muestra antes del procedimiento de tinción.

Tinción de muestras – tubo de PNH RBC 3-color (tira roja)

1. Etiquete el tubo de PNH RBC 3-color con la identificación de la muestra de sangre examinada.
2. Pipetee 50 µl de muestra de sangre diluida bien mezclada en el fondo del tubo de PNH RBC 3-color.

PRECAUCIÓN: Evite pipetear sangre en el lateral del tubo de ensayo. Si el frotis o la gota de sangre permanecen en el lateral del tubo, no se tintarán con el reactivo y los resultados de la prueba pueden ser inválidos.

3. Agite enérgicamente durante 7 – 10 segundos.

PRECAUCIÓN: Acortar el tiempo de vórtice puede afectar a los resultados de la prueba.

4. Incube el tubo de PNH RBC 3-color durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
5. Añada 4 ml de PBS 1X al tubo de PNH RBC 3-color.
6. Centrifugue el tubo de PNH RBC 3-color durante 5 minutos a $300\times$ g.

7. Deseche el sobrenadante sin disolver el sedimento celular y añada 0,5 ml de PBS 1X al tubo de PNH RBC 3-color.
8. Agite brevemente para resuspender el sedimento celular.

Adquiera la muestra tintada utilizando el citómetro de flujo. Si la muestra tintada no se adquiere inmediatamente, tape el tubo de ensayo, guárdelo a 2 – 8 °C en la oscuridad y analícelo en un plazo de 2 horas.

PRECAUCIÓN: Altere los agregados celulares de la muestra tintada deslizando el tubo de ensayo contra la gradilla inmediatamente antes de la obtención en el citómetro de flujo. Una cantidad excesiva de agregados de glóbulos rojos puede afectar a los resultados de la prueba.

Tinción de muestras – tubo de PNH WBC 7-color tube (tira cian)

1. Etiquete el tubo de PNH WBC 7-color con la identificación de la muestra de sangre examinada.
2. Añada 50 µl de agua desionizada al tubo de PNH WBC 7-color. Agite enérgicamente durante 7 – 10 segundos.

PRECAUCIÓN: Acortar el tiempo de vórtice puede afectar a los resultados de la prueba.

3. Pipetee 100 µl de muestra de sangre bien mezclada en el fondo del tubo de PNH WBC 7-color y agite enérgicamente.

PRECAUCIÓN: Evite pipetear sangre en el lateral del tubo de ensayo. Si el frotis o la gota de sangre permanecen en el lateral del tubo, no se tinarán con el reactivo y los resultados de la prueba pueden ser inválidos.

4. Incube durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
5. Añada 2 ml de la solución de lisado de eritrocitos 1X al tubo de PNH WBC 7-color.
6. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
7. Centrifugue el tubo de PNH WBC 7-color durante 5 minutos a 300× g.
8. Deseche el sobrenadante sin disolver el sedimento celular y añada 2 ml de PBS 1X al tubo de ensayo.
9. Centrifugue el tubo de PNH WBC 7-color durante 5 minutos a 300× g.
10. Deseche el sobrenadante sin disolver el sedimento celular y añada 0,2 ml de PBS 1X al tubo de ensayo.
11. Agite brevemente para resuspender el sedimento celular.

Adquiera la muestra tintada utilizando el citómetro de flujo. Si la muestra tintada no se adquiere inmediatamente, tape el tubo de ensayo, guárdelo a 2 - 8 °C en la oscuridad y analícelo en 24 horas.

Análisis por citometría de flujo

El citómetro de flujo seleccionado para su uso con el dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit se calibrará de forma rutinaria utilizando microperlas fluorescentes para garantizar una sensibilidad estable de los detectores de acuerdo con las instrucciones del fabricante del citómetro.

Si no se mantiene adecuadamente, el citómetro de flujo puede producir resultados falsos.

Consulte las especificaciones del fabricante del citómetro para láseres y detectores de fluorescencia según las características de excitación y emisión de los fluorocromos en la Sección 6 Equipo necesario.

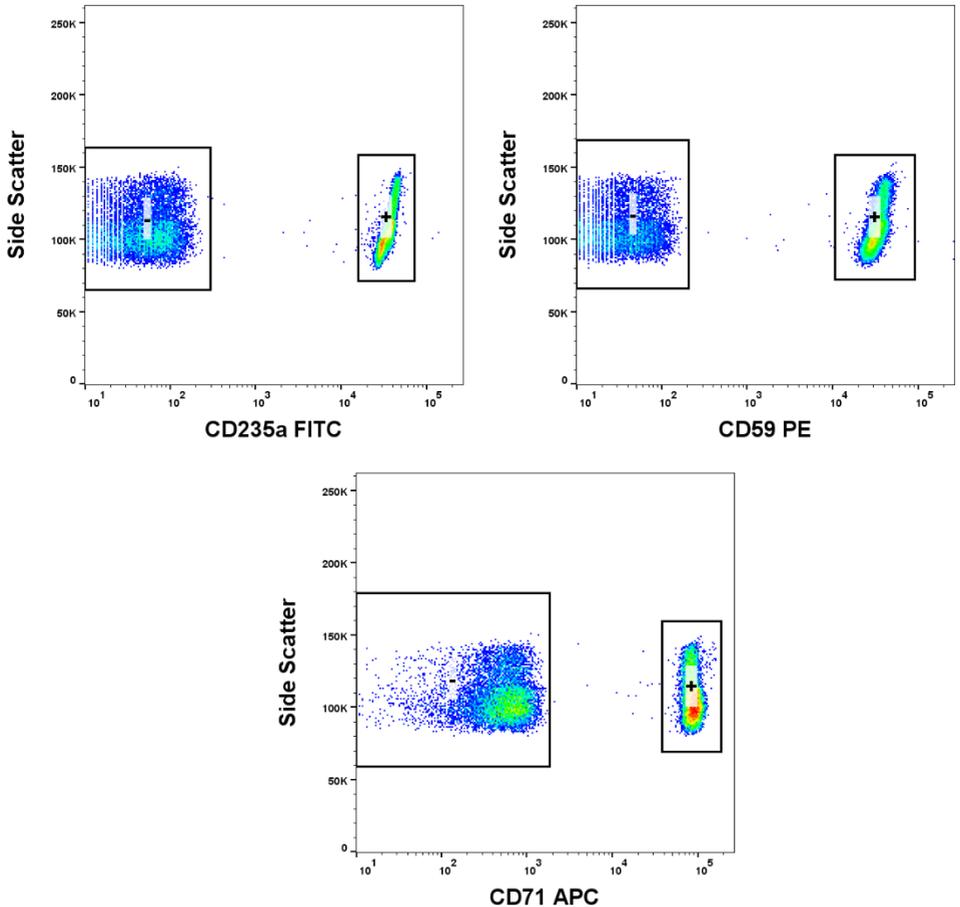
Para el análisis de datos medidos, es posible utilizar software de citómetro desarrollado por el fabricante, o software dedicado para el análisis de datos de citometría fuera de línea (por ejemplo FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Análisis de los tubos de compensación de PNH RBC 3-color (tira roja)

Visualice los datos no compensados para cada tubo de compensación en un gráfico de puntos de dispersión lateral (SSC) frente a "fluorocromo a compensar".

Configure las puertas para las partículas de compensación de la citometría positiva (+) y negativa (-) como se muestra en la Figura 1.

Figura 1 Identificación de las partículas de compensación de la citometría positiva (+) y negativa (-) en tubos de compensación (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

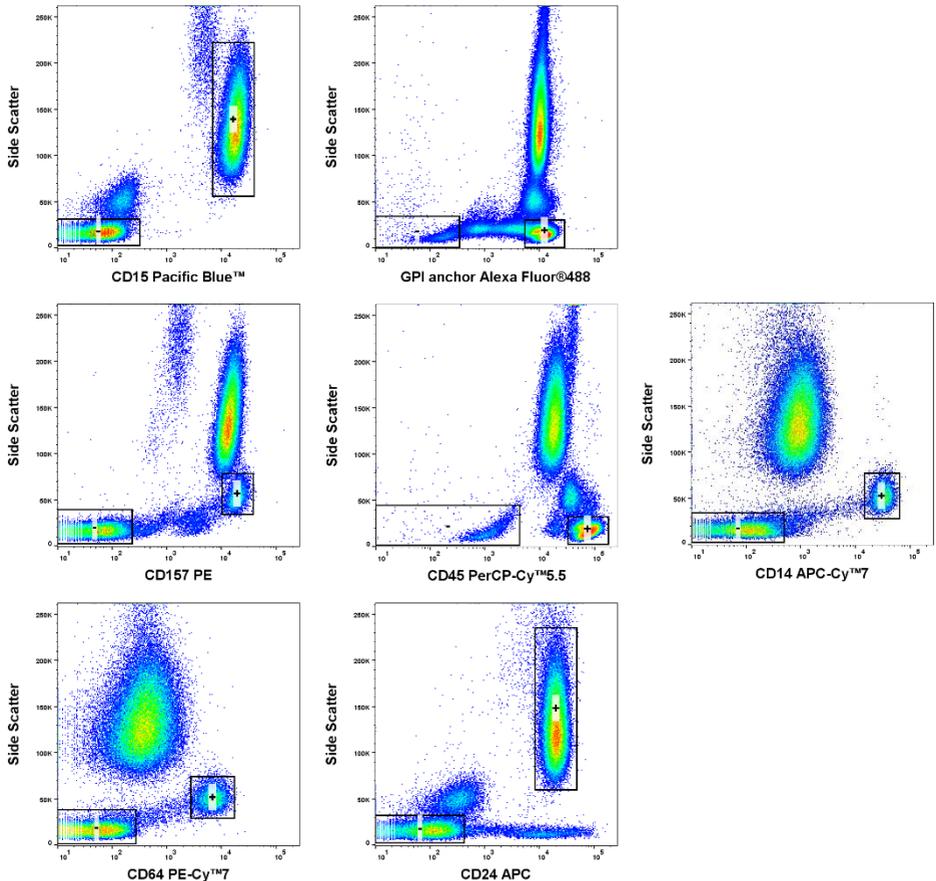


Análisis de los tubos de compensación de PNH WBC 7-color (tira cian)

Visualice los datos no compensados para cada tubo de compensación en un gráfico de puntos de dispersión lateral (SSC) frente a "fluorocromo a compensar".

Configure las puertas para las poblaciones más positivas (+) y más negativas (-) como se muestra en la Figura 2.

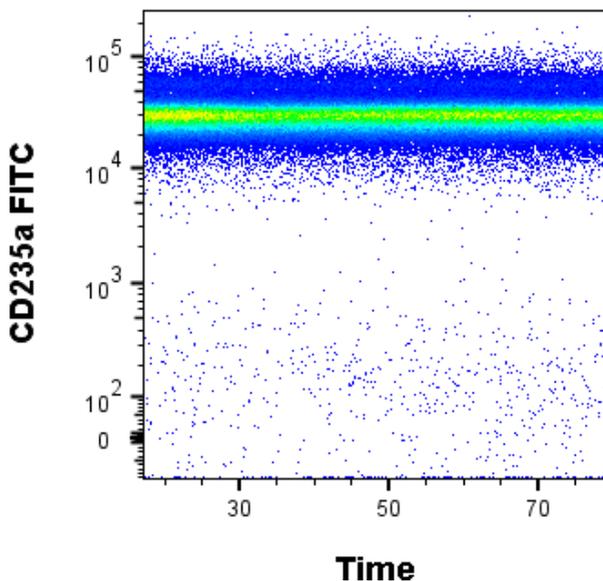
Figura 2 Identificación de los eventos más positivos (+) y más negativos (-) en los tubos de compensación (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).



Tubo de PNH RBC 3-color (tira roja)

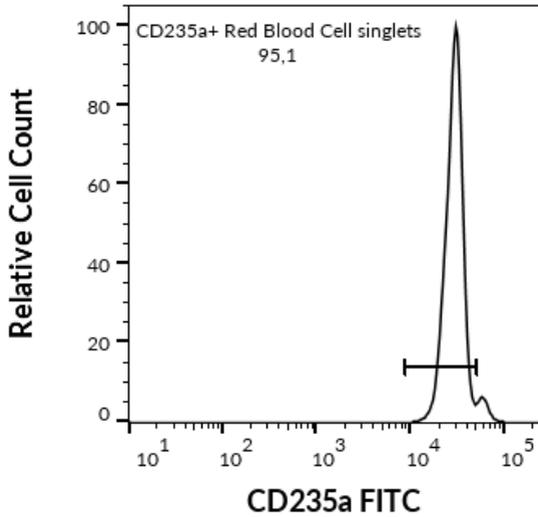
Debido al recuento bajo de iRBCs en la muestra de sangre diluida, obtenga 500 000 – 1 500 000 eventos eritrocitarios para el análisis. La adquisición de $\geq 500\,000$ eventos dan lugar a tiempos de obtención largos. Esto puede afectar al equilibrio del complejo de unión antígeno-anticuerpo y a la disminución de la fluorescencia FITC de CD235a. Controle siempre la estabilidad de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo de adquisición (Figura 3).

Figura 3 Todos los eventos adquiridos en un diagrama de puntos CD235a FITC frente a Tiempo (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).



Visualice los datos compensados como un histograma donde el eje X representa la intensidad de fluorescencia en el canal FITC. Ajuste la puerta de los "singletes de glóbulos rojos CD235a+" (Figura 4).

Figura 4 Delineación de los singletes de glóbulos rojos CD235a+ (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

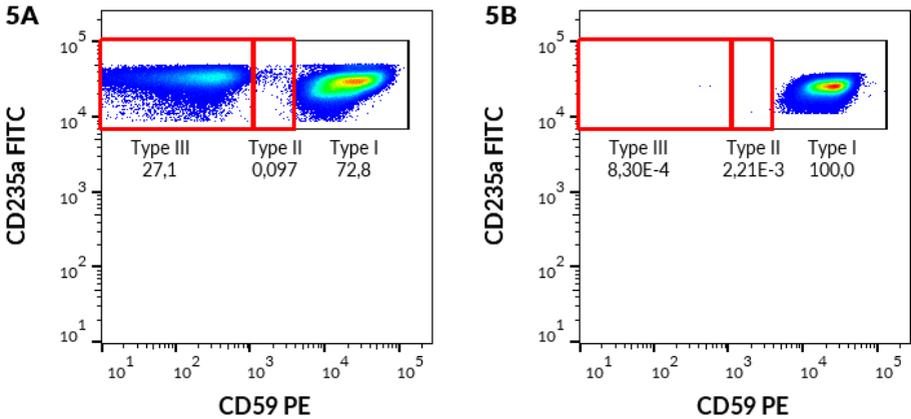


Eritrocitos

Visualice los singletes de glóbulos rojos CD235a+ en un gráfico de puntos de CD59 PE frente a CD235a FITC. Separe los eventos en tres poblaciones utilizando tres puertas apropiadas (Figura 5) y calcule el porcentaje de eventos en las regiones de Tipo I, Tipo II y Tipo III.

Figura 5 Singletes de glóbulos rojos CD235a+ en un gráfico de puntos de CD59 PE frente a CD235a FITC (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

A) paciente con clon de HPN; B) donante sano

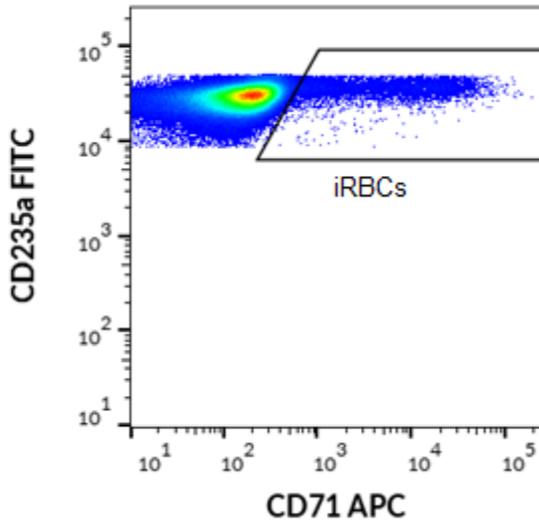


iRBCs (eritrocitos inmaduros)

Visualice los singletes de glóbulos rojos CD235a+ en un gráfico de puntos de CD71 APC frente a CD235a FITC y separe los iRBCs CD71+ (Figura 6).

Figura 6 Singletes de glóbulos rojos CD235a+ en un gráfico de puntos de CD71 APC frente a CD235a FITC.

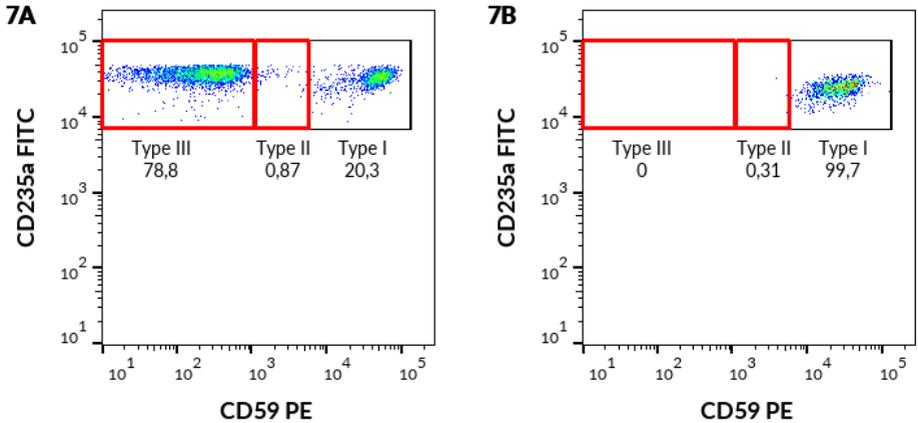
Delimitación de los iRBCs CD71+ (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).



Visualice los iRBCs CD71+ en un gráfico de puntos CD59 PE frente a CD235a FITC. Separe los eventos en tres poblaciones utilizando tres puertas apropiadas (Figura 7) y calcule el porcentaje de eventos en las regiones de Tipo I, Tipo II y Tipo III.

Figura 7 iRBCs CD71+ en un gráfico de puntos CD59 PE frente a CD235a FITC (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

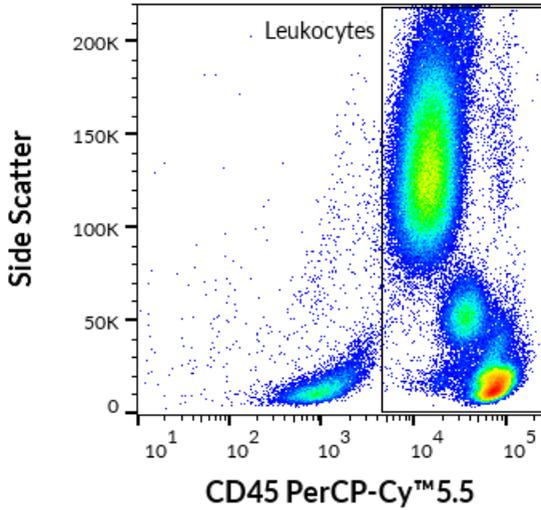
A) paciente con clon de HPN; B) donante sano



Tubo de PNH WBC 7-color (tira cian)

Adquiera al menos 200 000 eventos para su análisis. Visualice los datos compensados en un gráfico de puntos de difusión lateral frente a la intensidad de fluorescencia en PerCP-Cy™ 5.5. Ajuste la puerta de los leucocitos CD45+ como se muestra en la Figura 8.

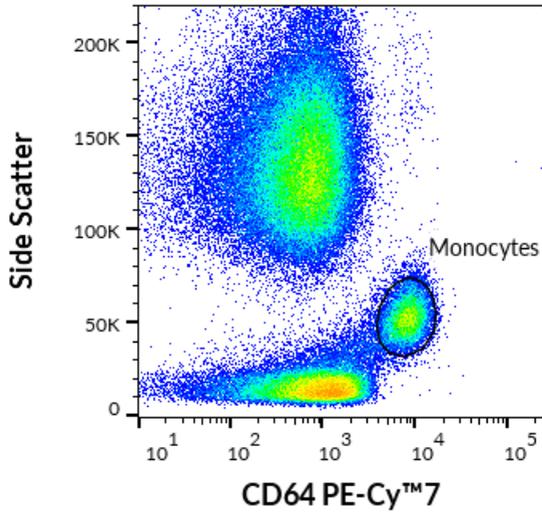
Figura 8 Delineación de leucocitos CD45+ (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II)



Monocitos

Visualice los leucocitos CD45 + en un -gráfico de puntos de difusión lateral- frente a CD64 PE-Cy™7 y delimite los monocitos CD64 + como se muestra en la Figura 9.

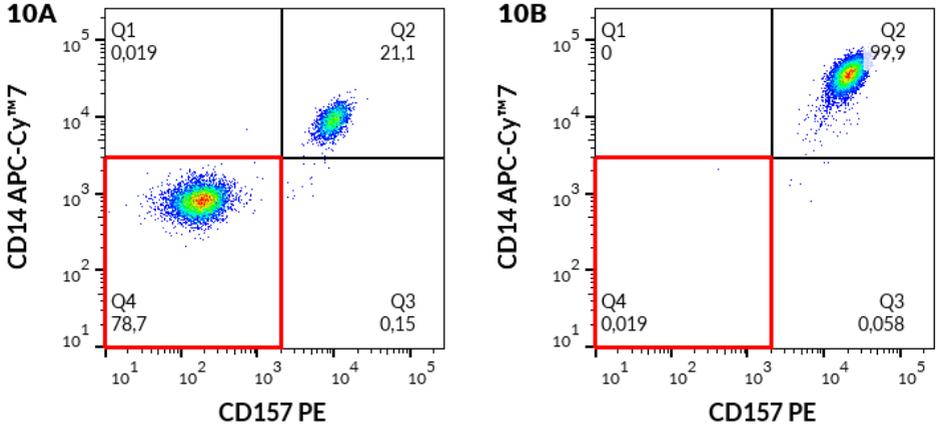
Figura 9 Delimitación de los monocitos CD64+ de los leucocitos (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).



Visualice los monocitos CD64+ en un gráfico de puntos-CD157 PE frente a CD14 APC-Cy™7 (Figura 10). Ajuste las puertas apropiadas y calcule el porcentaje de población de CD157-CD14- en el cuadrante Q4.

Figura 10 Monocitos CD64+ en un gráfico de puntos CD157 PE frente a CD14 APC-Cy™7 (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

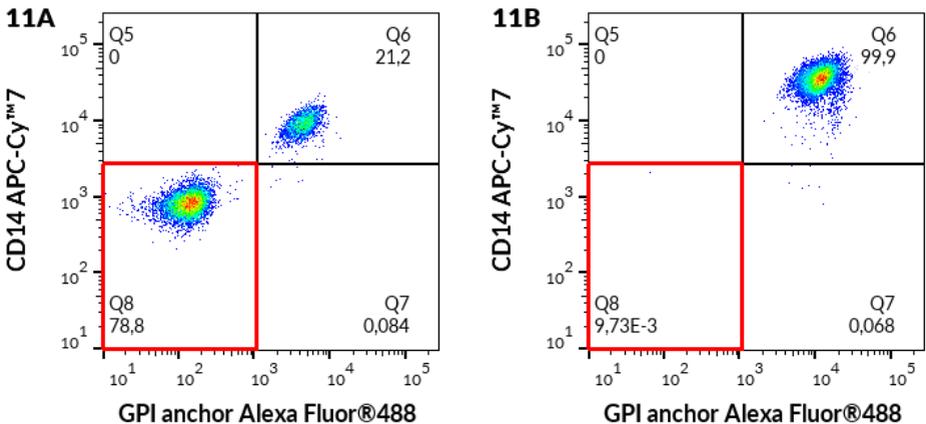
A) paciente con clon de HPN; B) donante sano



A continuación, visualice los mismos monocitos CD64+ en un gráfico de puntos con -proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD14 APC-Cy™7 (Figura 11). Ajuste las puertas apropiadas y calcule el porcentaje de población de CD14 con anclaje GPI en el cuadrante Q4.

Figura 11 Monocitos CD64+ en un diagrama de puntos con proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD14 APC Cy™7 (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

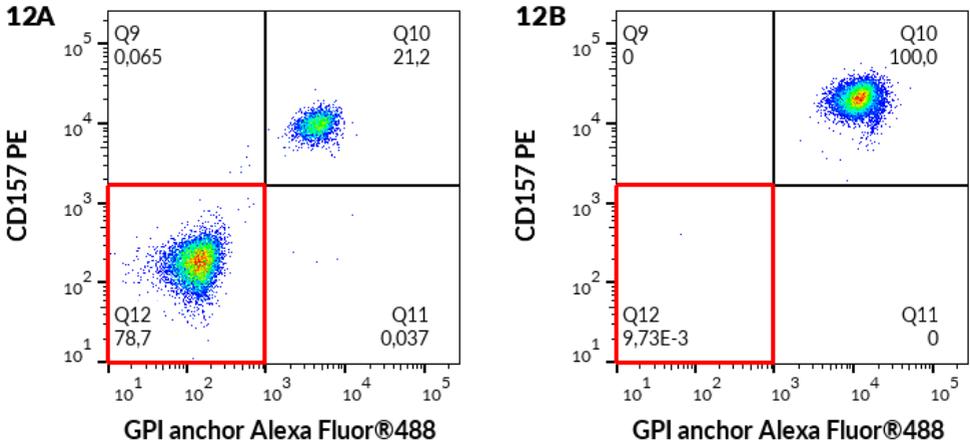
A) paciente con clon de HPN; B) donante sano



A continuación, visualice los mismos monocitos CD64+ en un gráfico de puntos con -proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD157 PE (Figura 12). Ajuste las puertas apropiadas y calcule el porcentaje de población de CD157 con anclaje GPI en el cuadrante Q4.

Figura 12 Monocitos CD64+ en un diagrama de puntos con proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD157 PE (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

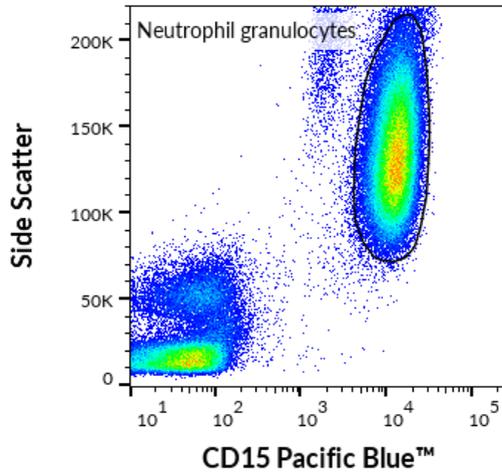
A) paciente con clon de HPN; B) donante sano



Granulocitos neutrófilos

Visualice los leucocitos CD45+ en un gráfico de puntos de -dispersión lateral- frente a CD15 Pacific Blue™ y separe los granulocitos neutrófilos CD15+ como se muestra en la Figura 13.

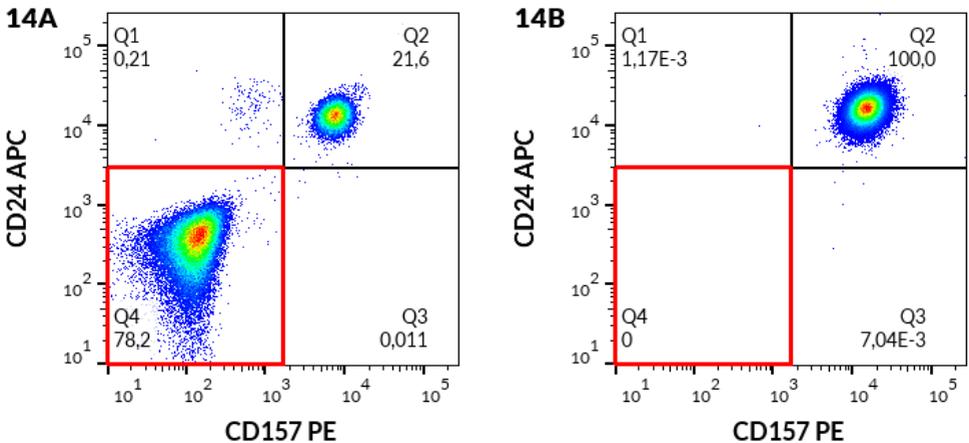
Figura 13 Delimitación de los granulocitos neutrófilos CD15+ de los leucocitos (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).



Visualice los granulocitos neutrófilos CD15+ en un gráfico de puntos -CD157 PE frente a CD24 APC como se muestra en la Figura 14. Ajuste las puertas apropiadas y calcule el porcentaje de población de CD157- CD24 en el cuadrante Q4.

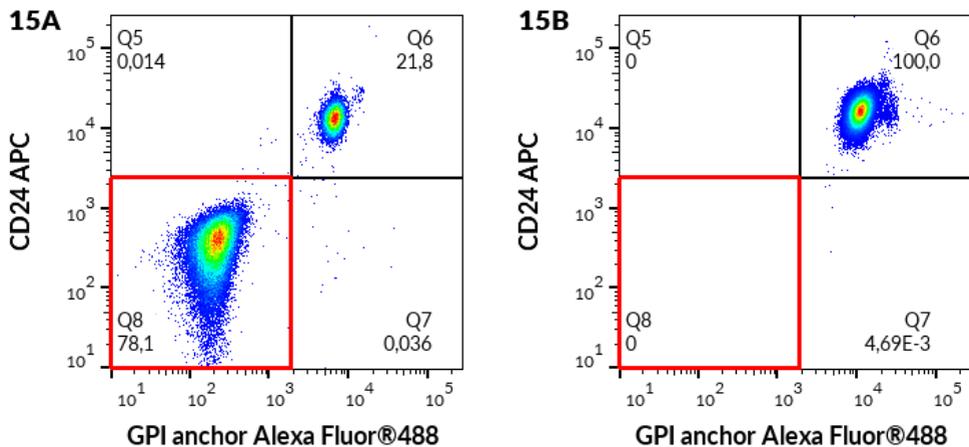
Figura 14 Granulocitos neutrófilos CD15+ en un gráfico de puntos -CD157 PE frente a CD24 APC (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).

A) paciente con clon de HPN; B) donante sano



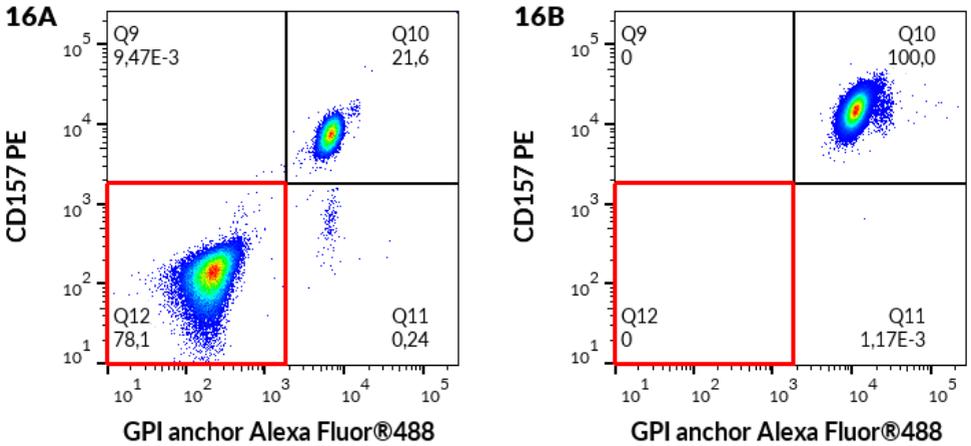
A continuación, visualice los mismos granulocitos neutrófilos CD15+ en un gráfico de puntos -de proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD24 APC, ajuste las puertas adecuadas y calcule el porcentaje de población de CD24- con anclaje GPI en el cuadrante Q4, como se muestra en la Figura 15.

Figura 15 Granulocitos neutrófilos CD15+ en un gráfico de puntos -de proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD24 APC (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).
A) paciente con clon de HPN; B) donante sano



A continuación, visualice los mismos granulocitos neutrófilos CD15+ en un gráfico de puntos -de proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD157 PE, ajuste las puertas adecuadas y calcule el porcentaje de población de CD157- con anclaje GPI en el cuadrante Q4, como se muestra en la Figura 16.

Figura 16 Granulocitos neutrófilos CD15+ en un gráfico de puntos -de proaerolisina con Alexa Fluor® 488 (anclaje GPI) frente a CD157 PE (datos adquiridos en BD FACSCanto™ II).
A) paciente con clon de HPN; B) donante sano



Cálculo e interpretación de los resultados analíticos

Enumere el porcentaje de células con deficiencia de GPI (con fenotipo de HPN), véase la Tabla 5.

Tabla 5 Fenotipos de clones de HPN

Población de células madre		Fenotipo de HPN según la estrategia de gating
Tubo de PNH RBC 3-color	Eritrocitos (Tipo III)	CD59- CD235a+ (Figura 5)
	Eritrocitos (Tipo II)	CD59 dim CD235a+ (Figura 5)
	iRBCs (Tipo III)	CD59- CD235a+CD71+ (Figura 7)
	iRBCs (Tipo II)	CD59 dim CD235a+CD71+ (Figura 7)
Tubo de g PNH WBC 7-color	Monocitos	CD14- CD157- CD64+ (Figura 10)
		CD14- con anclaje GPI- CD64+ (Figura 11)
		CD157- con anclaje GPI- CD64+ (Figura 12)
	Granulocitos neutrófilos	CD24- CD157- CD15+ (Figura 14)
		CD24- con anclaje GPI- CD15+ (Figura 15)
		CD157- con anclaje GPI- CD15+ (Figura 16)

Tabla 6 Interpretación de los resultados

Límite de detección (valor de corte) para los tubos de glóbulos blancos y glóbulos rojos expresado como frecuencia de progenitores (%), calculado a partir de 100 mediciones de n=25 muestras de pacientes normales en n=4 plataformas de citometría diferentes				
Fenotipo de HPN	Citómetro			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
Tubo de PNH RBC 3-color				
CD59- Glóbulos rojos de Tipo II y III	0.005	0.002	0.029	0.049
CD59- iRBCs de Tipo II y III	0.240	0.320	0.388	0.562
Tubo de PNH WBC 7-color				
CD157- CD14- monocitos	0.20	0.19	0.14	0.30
Monocitos- CD14- con anclaje GPI	0.08	0.04	0.10	0.17
Monocitos- CD157- con anclaje GPI	0.07	0.06	0.04	0.03
CD157- CD24- Granulocitos neutrófilos	0.02	0.02	0.06	0.03
CD24- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	0.03	0.03	0.02	0.02
CD157- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	0.01	0.01	0.01	0.01

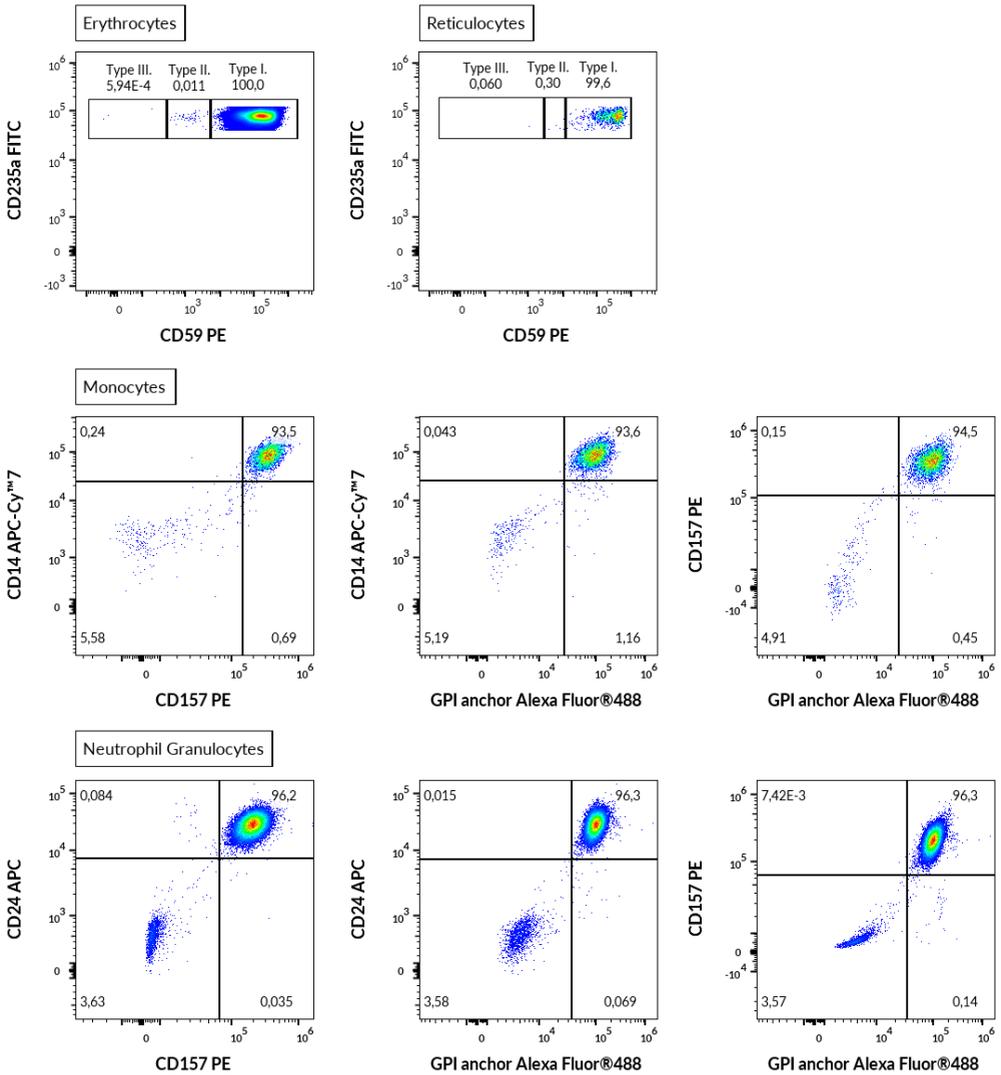
Reglas del algoritmo de notificación de deficiencias del GPI

1. En pacientes con una frecuencia de población celular con deficiencia de GPI **inferior** al valor de corte (Tabla 6), los resultados deben notificarse como: **"los granulocitos, monocitos, glóbulos rojos e iRBCs muestran una expresión normal de antígenos ligados a GPI. No se han detectado clones de HPN"** ⁽¹⁾.
2. En pacientes con una frecuencia de población celular **con deficiencia de GPI superior** al valor de corte (Tabla 6), los resultados deben notificarse como: **"los granulocitos, monocitos, glóbulos rojos o iRBCs muestran una deficiencia parcial o completa de GPI". Se han detectado clones de HPN.**

PRECAUCIÓN: El laboratorio clínico debe establecer sus propios valores del límite de detección (LOD por sus siglas en inglés)/valor de corte a partir de un conjunto de muestras de pacientes normales cuando se utiliza un tipo y/o marca de citómetro diferente al especificado en las Tablas 8 – 11 (véase la sección 11. Rendimiento analítico/Límite de detección/Valor de corte del ensayo).

3. En la mayoría de los casos de HPN, todas las poblaciones de células diana de los hematíes muestran la presencia del clon de HPN ^(4, 6, 7, 8). Los glóbulos blancos en los clones de HPN aparecen agrupados y menos dispersos que los eventos dobles negativos aleatorios.
4. En algunos casos, la presencia de un clon de HPN puede detectarse en un tubo de glóbulos blancos, mientras que no se detecta en un tubo de glóbulos rojos, como se muestra en la **Figura 17**. En este caso, la presencia de un clon de HPN debe notificarse según **la regla 2 del algoritmo de notificación de deficiencias de GPI**.
5. Si se detecta algún clon de HPN, informe siempre del porcentaje de todos los fenotipos de clones de HPN (Tabla 6) de su población de células progenitoras. Los monocitos pueden mostrar un tamaño de clon de HPN mayor que los granulocitos neutrófilos ⁽²⁾.
6. La deficiencia de GPI (presencia de clon de HPN) debe expresarse en todos los fenotipos de HPN dentro de un subconjunto determinado de leucocitos. Se espera que todos los fenotipos de monocitos en HPN (Tabla 5) tiñan de forma similar las células deficientes en GPI⁽⁶⁾. Lo mismo puede decirse de los fenotipos de neutrófilos de HPN.

Figura 17 Ejemplo de un caso con presencia de un clon de HPN en un tubo de glóbulos blancos, mientras que no se detecta en un tubo de glóbulos rojos (datos adquiridos en Beckman Coulter DxFLEx).



11. Rendimiento analítico

Especificidad

La proaerolisina con Alexa Fluor® 488 es una variante marcada con fluorescencia de la aerolisina bacteriana que se une específicamente a los anclajes GPI de las proteínas de la membrana superficial de las células humanas ^(1, 2, 5, 8).

El anticuerpo SY11B5 reconoce un epítipo extracelular en el antígeno CD157 expresado principalmente en monocitos y granulocitos. El HCDM Council (taller HLDA X) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo 2D1 reconoce todas las isoformas leucocitarias del CD45 humano (antígeno común leucocitario). El HCDM Council (taller HLDA III) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo 10.1 reconoce el antígeno CD64 humano, que se expresa en los monocitos. Los talleres HLDA (taller HLDA III: Código WS M-250) han confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo SN3 reacciona con el antígeno CD24, expresado por los granulocitos. El taller HLDA (HLDA IV: Código WS B 136; HLDA V: Código WS B CD24.7) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo MEM-15 reacciona con CD14, una glicoproteína de membrana extracelular ligada a GPI (glucosilfosfatidilinositol) que se expresa en los monocitos. El HCDM Council (HLDA III: Código WS M 252; HLDA IV: Código WS M 113; HLDA IV: Código WS NL 90; HLDA IV: Código WS T 53; HLDA V: Código WS M MA086; HLDA VI: taller de Código WS M MA94) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo MEM-158 reacciona con CD15, fuertemente expresado en la superficie de los granulocitos. El HCDM Council (taller HLDA VI: Código WS AS A053) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo JC159 reconoce un epítipo de la porción extracelular de CD235a (glicoforina A), una sialoglicoproteína expresada en eritroblastos tempranos, eritroblastos tardíos, eritroblastos y eritrocitos maduros.

El anticuerpo MEM-43 reacciona con un epítipo bien definido en CD59 (protectina), glicoproteína anclada a GPI que se expresa en la superficie de todas las células hematopoyéticas. El taller HLDA (HLDA IV: Código WS NL 705; HLDA V: Código WS AS S013; HLDA V: Código WS BP BP345; taller HLDA V: Código WS T T-103) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

El anticuerpo MEM-75 reacciona con un epítipo extracelular del antígeno CD71 expresado en los iRBCs inmaduros. El taller HLDA (HLDA IV: Código WS A 45; HLDA V: Código WS T T-165) ha confirmado la especificidad del anticuerpo.

Precisión

La precisión del método se determinó comparando el kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay con el método interno de un laboratorio clínico acreditado mediante tinción paralela de 13 pacientes con presencia confirmada del fenotipo de HPN. Los parámetros del análisis de regresión lineal figuran en la Tabla 7.

Tabla 7 Análisis de regresión lineal para recuentos relativos de poblaciones celulares deficientes en GPI (fenotipos de HPN) en pacientes con presencia confirmada de fenotipos de HPN (comparación del kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay con un método interno de un laboratorio clínico acreditado (un cóctel de anticuerpos conjugados de un solo color de diferentes fabricantes y analizados mediante el BD FACSCanto™ II))

Subgrupo de linfocitos	n	Pendiente	Intersección	R ²	Intervalo [%]
Eritrocitos CD59- CD235a+ Tipo III	13	0.99	-0.026	1.00	1.28 - 83.79
iRBCs CD59- CD235a+ Tipo III	13	0.99	-0.384	1.00	5.97 - 97.78
Eritrocitos CD59- CD235a+ Tipo II	13	1.00	-0.059	1.00	0.13 - 89.92
iRBCs CD59- CD235a+ Tipo II	13	0.98	0.141	1.00	0.33 - 74.67
Monocitos CD157- anclaje GPI- CD64+	13	1.00	0.060	1.00	2.07 - 99.95
CD157- con anclaje GPI- neutrófilos CD15+	13	0.99	0.294	1.00	0.80 - 99.82
CD14- con anclaje GPI- monocitos CD64+	13	No determinado			2.04 - 99.96
CD14- CD157- monocitos CD64+	13	No determinado			2.17 - 99.96
CD24- CD157- neutrófilos CD15+	13	No determinado			0.80 - 99.83
CD24- con anclaje GPI- neutrófilos CD15+	13	No determinado			0.81 - 99.80

n = número de muestras de sangre

Límite de detección/Límite de cuantificación/Assay Cut-off

Se ha determinado el límite de detección (LOD) para cada población de interés (véase la Tabla 5) como un valor medio de los resultados de 25 donantes de sangre sanos incrementado por la incorporación de tres desviaciones estándar de la media para 4 plataformas de citometría de flujo diferentes y expresado como Valor de corte del ensayo en las Tablas 8, 9, 10 y 11.

PRECAUCIÓN: El laboratorio clínico debe establecer sus propios valores del límite de detección (LOD por sus siglas en inglés)/valor de corte a partir de un conjunto de muestras de pacientes normales cuando se utiliza un tipo y/o marca de citómetro diferente al especificado en las Tablas 8 – 11.

Tabla 8 Valores de corte del kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay para cada fenotipo de HPN junto con la incidencia del fenotipo de HPN y LOQ adquiridos en el citómetro de flujo BD FACSLytic™.

Fenotipo de HPN	BD FACSLytic™					
	n	Media [%]	SD [%]	Incidencia del fenotipo HPN	Valor de corte (Media + 3*SD)	LOQ (Media + 10*SD)
Tubo de glóbulos rojos (1 000 000 de eventos adquiridos; mín. 80 % de eventos de singletes de glóbulos rojos)						
CD59- Glóbulos rojos de Tipo II y III	25	0.003	0.001	5 – 48 eventos por cada 1 000 000 de eventos (media de 25 eventos)	0.005 %	0.012 %
CD59- iRBCs de Tipo II y III	25	0.054	0.061	0 – 5 eventos por 3 000 iRBCs (media de 2 eventos)	0.240 %	0.660 %
Tubo de glóbulos blancos (200 000 eventos adquiridos)						
CD157- CD14- monocitos	25	0.076	0.041	2 – 24 eventos por 10 000 monocitos (media de 8 eventos)	0.20 %	0.49 %
Monocitos- CD14- con anclaje GPI	25	0.021	0.018	0 – 5 eventos por 10 000 monocitos (media de 2 eventos)	0.08 %	0.20 %
Monocitos- CD157- con anclaje GPI	25	0.014	0.020	0 – 4 eventos por 10 000 monocitos (media de 1 evento)	0.07 %	0.21 %
CD157- CD24- Granulocitos neutrófilos	25	0.006	0.006	0 – 20 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 5 eventos)	0.02 %	0.07 %

CD24- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.006	0.008	0 – 29 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 6 eventos)	0.03 %	0.09 %
CD157- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.002	0.002	0 – 8 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 2 eventos)	0.01 %	0.02 %

Tabla 9 Valores de corte del kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay para cada fenotipo de HPN junto con la incidencia del fenotipo de HPN y LOQ adquiridos en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II.

Fenotipo de HPN	BD FACSCanto™ II					
	n	Media [%]	SD [%]	Incidencia del fenotipo HPN	Valor de corte (Media + 3*SD)	LOQ (Media + 10*SD)
Tubo de glóbulos rojos (1 000 000 de eventos adquiridos; mín. 80 % de eventos de singletes de glóbulos rojos)						
CD59- Glóbulos rojos de Tipo II y III	25	0.0006	0,0004	1 – 12 eventos por cada 1 000 000 de eventos (media de 6 eventos)	0.002 %	0.004 %
CD59- iRBCs de Tipo II y III	25	0.0657	0.0847	0 – 5 eventos por 1 000 iRBCs (media de 1 evento)	0.320 %	0.913 %
Tubo de glóbulos blancos (200 000 eventos adquiridos)						
CD157- CD14- monocitos	25	0.085	0.035	2 – 16 eventos por 10 000 monocitos (media de 8 eventos)	0.19 %	0.43 %
Monocitos- CD14- con anclaje GPI	25	0.086	0.096	0 – 3 eventos por 10 000 monocitos (media de 1 evento)	0.04 %	0.10 %
Monocitos- CD157- con anclaje GPI	25	0.084	0.019	0 – 7 eventos por 10 000 monocitos (media de 1 evento)	0.06 %	0.20 %
CD157- CD24- Granulocitos neutrófilos	25	0.004	0.052	0 – 17 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 5 eventos)	0.02 %	0.06 %
CD24- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.006	0.010	0 – 32 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 6 eventos)	0.03 %	0.10 %

CD157- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.002	0.002	0 – 8 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 2 eventos)	0.01 %	0.02 %
--	----	-------	-------	--	--------	--------

Tabla 10 Valores de corte del kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay para cada fenotipo de HPN junto con la incidencia del fenotipo de HPN y LOQ adquiridos en el citómetro de flujo Beckman Coulter Navios EX.

Fenotipo de HPN	Beckman Coulter Navios EX					
	n	Media [%]	SD [%]	Incidencia del fenotipo HPN	Valor de corte (Media + 3*SD)	LOQ (Media + 10*SD)
Tubo de glóbulos rojos (1 000 000 de eventos adquiridos; mín. 80 % de eventos de singletes de glóbulos rojos)						
CD59- Glóbulos rojos de Tipo II y III	25	0.007	0.007	4 – 236 eventos por cada 1 000 000 de eventos (media de 60 eventos)	0.029 %	0.081 %
CD59- iRBCs de Tipo II y III	25	0.087	0.100	0 – 6 eventos por 1 000 iRBCs (media de 1 evento)	0.388 %	1.092 %
Tubo de glóbulos blancos (200 000 eventos adquiridos)						
CD157- CD14- monocitos	25	0.062	0.027	0 – 23 eventos por 10 000 monocitos (media de 6 eventos)	0.14 %	0.33 %
Monocitos- CD14- con anclaje GPI	25	0.024	0.006	0 – 10 eventos por 10 000 monocitos (media de 2 eventos)	0.10 %	0.28 %
Monocitos- CD157- con anclaje GPI	25	0.007	0.011	0 – 6 eventos por 10 000 monocitos (media de 1 evento)	0.04 %	0.12 %
CD157- CD24- Granulocitos neutrófilos	25	0.012	0.015	0 – 43 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 12 eventos)	0.06 %	0.16 %
CD24- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.005	0.005	0 – 13 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 5 eventos)	0.02 %	0.05 %
CD157- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.002	0.002	0 – 10 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 2 eventos)	0.01 %	0.03 %

Tabla 11 Valores de corte del kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay para cada fenotipo de HPN junto con la incidencia del fenotipo de HPN y LOQ adquiridos en el citómetro de flujo Beckman Coulter DxFLEx.

Fenotipo de HPN	Beckman Coulter DxFLEx					
	n	Media [%]	SD [%]	Incidencia del fenotipo HPN	Valor de corte (Media + 3*SD)	LOQ (Media + 10*SD)
Tubo de glóbulos rojos (1 000 000 de eventos adquiridos; mín. 80 % de eventos de singletes de glóbulos rojos)						
CD59- Glóbulos rojos de Tipo II y III	25	0,015	0.012	5 – 48 eventos por cada 1 000 000 de eventos (media de 25 eventos)	0.049 %	0.129 %
CD59- iRBCs de Tipo II y III	25	0.106	0.152	0 – 5 eventos por 1 000 iRBCs (media de 2 eventos)	0.562 %	1.626 %
Tubo de glóbulos blancos (200 000 eventos adquiridos)						
CD157- CD14- monocitos	25	0.092	0.068	0 – 27 eventos por 10 000 monocitos (media de 10 eventos)	0.30 %	0.77 %
Monocitos- CD14- con anclaje GPI	25	0.053	0.040	0 – 16 eventos por 10 000 monocitos (media de 6 eventos)	0.17 %	0.46 %
Monocitos- CD157- con anclaje GPI	25	0.005	0.009	0 – 1 eventos por 10 000 monocitos (media de 1 evento)	0.03 %	0.10 %
CD157- CD24- Granulocitos neutrófilos	25	0.010	0.008	0 – 28 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 10 eventos)	0.03 %	0.09 %
CD24- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.008	0.006	0 – 20 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 8 eventos)	0.02 %	0.06 %
CD157- con anclaje GPI- Granulocitos neutrófilos	25	0.002	0.002	0 – 5 eventos por 100 000 neutrófilos (media de 2 eventos)	0.01 %	0.02 %

AVISO: Para el análisis de citometría de flujo se utilizaron los siguientes citómetros de flujo, incluida la versión de software:

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

Para la evaluación de los datos medidos se utilizó la siguiente plataforma de análisis:

FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - versión 10.9.0

12. Rendimiento clínico

Pacientes con deficiencia de GPI

Se recogieron datos clínicos en un centro clínico de 19 pacientes, tanto sanos ⁽⁶⁾ como con deficiencia de GPI confirmada ⁽¹³⁾. El rendimiento clínico se determinó como una comparación del kit de ensayo de HPN de alta sensibilidad DryFlowEx con un método interno de un laboratorio clínico acreditado (un cóctel de anticuerpos conjugados de un solo color de diferentes fabricantes y analizados mediante el BD FACSCanto™ II).

Se ha evaluado la deficiencia de GPI en los pacientes en relación con el método utilizado (Tabla 12) mediante la detección de células con deficiencia de GPI (clones de HPN).

Tabla 12 Rendimiento clínico del kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Evaluación del déficit de GPI mediante el método interno de un laboratorio clínico acreditado	
		Deficiencia de GPI	Estado normal
Evaluación de la deficiencia de GPI mediante el kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Deficiencia de GPI	13 pacientes	0 pacientes
	Estado normal	0 pacientes	6 pacientes

13. Valores previstos

Intervalo de referencia

En la población normal no se detecta deficiencia de GPI y se espera que todos los valores porcentuales del fenotipo de HPN sean inferiores al punto de Assay Cut-off (LOD) ⁽⁶⁾.

14. Limitaciones

No se han identificado limitaciones para su uso en tipos específicos de enfermedades, como las anemias.

La notificación de deficiencias de GPI está limitada por las directrices publicadas sobre el estado actual de la técnica ⁽⁶⁾.

15. Referencias

- 1) Borowitz, MJ et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):211-30. doi: 10.1002/cyto.b.20525.
- 2) Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2012; 82B: 195–208.
- 3) Marinov I, Illingworth AJ, Benko M, Sutherland DR. Performance

Characteristics of a Non-Fluorescent Aerolysin-Based Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) Assay for Simultaneous Evaluation of PNH Neutrophils and PNH Monocytes by Flow Cytometry, Following Published PNH Guidelines. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Mar;94(2):257-263. doi: 10.1002/cyto.b.21389. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27294344.

- 4) Dezern, AE and Borowitz, MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 – clinical utility. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 16– 22.
- 5) Sutherland, DR, Illingworth, A, Marinov, I, Ortiz, F, Andreasen, J, Payne, D, Wallace, PK and Keeney, M. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 – reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 23–48.
- 6) Illingworth, A, Marinov, I, Sutherland, DR, Wagner-Ballon, O and DelVecchio, L. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 49– 66.
- 7) Sutherland DR, Richards SJ, Ortiz F, Nayyar R, Benko M, Marinov I, Illingworth A. CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal immature RBCs in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Mar;98(2):179-192. doi: 10.1002/cyto.b.21853. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31705743.
- 8) Sutherland DR, Ortiz F, Quest G, Illingworth A, Benko M, Nayyar R, Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jul;94(4):637-651. doi: 10.1002/cyto.b.21626. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29381839.
- 9) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
- 10) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
- 11) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: *Clin Chem* 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
- 12) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.

- 13) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x.
- 14) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.
- 15) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem.* 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
- 16) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
- 17) Hervé Lecoœur, Marie-Lise Gougeon, Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *Journal of Immunological Methods*, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 18) Bartels EM, Falbe Wätjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis.* 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
- 19) XUE Yan, XU Li, DANG Liheng, WANG Chao, CUI Yaqiong, WANG Ping, WANG Ning, ZHANG Xinjie, LIU Yang. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2022, 37(12): 1169-1173.
- 20) van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, et al. (2012) Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE* 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>.
- 21) Yasmine Van Caeneghem, Stijn De Munter, Paola Tieppo, Glenn Goetgeluk, Karin Weening, Greet Verstichel, Sarah Bonte, Tom Taghon, Georges Leclercq, Tessa Kerre, Reno Debets, David Vermijlen, Hinrich Abken & Bart

- Vandekerckhove (2017) Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities, *Oncolmunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460.
- 22) Lamia Achour, Mark G. H. Scott, Hamasseh Shirvani, Alain Thuret, Georges Bismuth, Catherine Labbé-Jullié, Stefano Marullo; CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009; 113 (9): 1938–1947. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141275>.
- 23) A. Stronkhorst, G. N. J. Tytgat & S. J. H. Van Deventer (1992) CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27:sup194, 61-65, DOI: 10.3109/00365529209096029.
- 24) Zinzani, P.L., Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 177–190 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>.
- 25) Whiteman KR, Johnson HA, Mayo MF, Audette CA, Carrigan CN, LaBelle A, Zukerberg L, Lambert JM, Lutz RJ. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small cell lung cancer in human xenograft models. *MAbs*. 2014 Mar-Apr;6(2):556-66. doi: 10.4161/mabs.27756. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24492307; PMCID: PMC3984343.
- 26) J Frengen, B Kierulf, R Schmid, T Lindmo, K Nustad, Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, *Clinical Chemistry*, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>.
- 27) Urbina, A. and Palomino, F. (2013), Reticulocyte count in red-blood-cell units stored in AS-1. *Vox Sang*, 104: 331-336. <https://doi.org/10.1111/vox.12011>
- 28) Ware RE, Rosse WF, Hall SE; Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 86 (4): 1586–1589. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V86.4.1586.bloodjournal8641586>.

16. Resumen sobre seguridad y funcionamiento

El resumen de seguridad y funcionamiento estará disponible en la base de datos Eudamed en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Hasta entonces, el resumen de seguridad y funcionamiento está disponible previa solicitud.

17. Uso de marcas comerciales de terceros

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™ y BD Multitest™ son marcas comerciales registradas de Becton, Dickinson and Company, Cy™ es una marca registrada de

Cytiva, VenturiOne® es una marca registrada de Applied Cytometry, Infinicyt™ es una marca registrada de Cytognos S.L., SPHERO™ COMPtrol es una marca registrada de Spherotech, Inc..

18. Historial de revisiones

Versión 2, ED7750_IFU_v2

- 1) Se han añadido interferencias endógenas y exógenas.
- 2) Se ha actualizado el apartado "Reglas del algoritmo de notificación de deficiencias de las GPI".
- 3) Apartado 13. Valores previstos - pequeñas correcciones de texto.
- 4) Referencias actualizadas.
- 5) Se ha añadido el número de identificación del organismo notificado.
- 6) Se ha añadido el nuevo número de capítulo 16. Resumen sobre seguridad y funcionamiento.

19. Fabricante

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

Información de contacto

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

20. Representantes autorizados

N/A

AVISO: Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto deberá notificarse al fabricante y a la autoridad local competente.