

## REDQUANT PNH

Kit zur Diagnostik der Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie  
auf Erythrozyten mittels Durchflusszytometrie

Für die In-vitro-Diagnostik in Kombination mit dem  
CELLQUANT PNH Kit (Art.nr. 7201)



Kit für 12 Bestimmungen

Art.nr. 7301



### 1 EINLEITUNG

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine erworbene und seltene klonale Erkrankung. Sie äußert sich in einer intravaskulären hämolytischen, durch die Lyse der Erythrozyten gekennzeichneten Anämie.

Die PNH resultiert aus einem Defizit des PIG-A-Gens, welches bei der Glycosylphosphatidylinositol-Synthese (oder GPI) und damit bei der Verankerung bestimmter Proteine an der Membran beteiligt ist. CD55 und CD59 sind GPI-verankerte Moleküle, die beim Schutz der Zellen gegen eine Komplement-vermittelte Lyse eine Rolle spielen. Bei PNH weisen die Zellen ein Defizit an CD55 und CD59 auf und sind somit für die Komplement-vermittelte Lyse zugänglich

### 2 PRINZIP

Einfarbige zytometrische Analyse der CD55- und CD59-Antigene auf der Oberfläche der Erythrozyten. Der relative Anteil an CD55- und CD59-defizienten Erythrozyten wird durch vorkalibrierte Beads bestimmt. Hierbei wird ein Analyseregion erstellt, in welche die CD55- und CD59-defizienten Erythrozyten fallen und dadurch von den normalen Erythrozyten unterschieden werden können.

### 3 REAGENZIEN

- **Reagens 1:** 1x 15 ml Fläschchen, 10fach konzentriertes Verdünnungsmittel
- **Reagens 2a:** 1x 240 µl Fläschchen, monoklonaler anti-CD55 Antikörper
- **Reagens 2b:** 1x 240 µl Fläschchen, monoklonaler anti-CD59 Antikörper
- **Reagens 3a:** 1x 480 µl Fläschchen, vorkalibrierte α-Beads. Diese Beads sind durch den Wert α gekennzeichnet, welcher für die Interpretation der CD55-Defizienz erforderlich ist.
- **Reagens 3b:** 1x 480 µl Fläschchen, vorkalibrierte β-Beads. Diese Beads sind durch den Wert β gekennzeichnet, welcher für die Interpretation der CD59-Defizienz erforderlich ist. Die Werte α und β sind auf dem in jedem Kit befindlichen Kalibrierungsetikett angegeben und können je nach Testserie variieren.
- **Reagens 4:** 1x 960 µl Fläschchen, Nachweisreagens, FITC-gekoppelter - polyklonaler anti-Maus IgG Antikörper.

Der Reagenzgefäß-Ständer besitzt Vertiefungen für die Röhren und die dazugehörigen Verschlüsse, wodurch eine Kontamination zwischen den Reagenzien vermieden wird

### 4 VORSICHTSMASSNAHMEN

Einhaltung der Guten Laborpraxis.

- Alle Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid und müssen deshalb unter Einhaltung von Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Natriumazid kann mit Blei und Kupferrohrlösungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Beseitigung sollte mit großen Mengen Wasser sorgfältig nachgespült werden, um deren Bildung zu verhindern.

- Blut muss als potenziell infektiös betrachtet werden.
- Die Abfallentsorgung muss gemäß den bestehenden örtlichen Vorschriften erfolgen

### 5 NOTWENDIGE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE GERÄTE

- Vortex-Mischer.
- Chronometer.
- Durchflußzytometer.
- Hämolyseröhren für das Durchflußzytometer.
- Verstellbare Pipetten mit Einwegspitzen (10 µl bis 1ml).
- Pipetten (1 und 2 ml).
- Destilliertes Wasser
- 
- 

### 6 VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Das ungeöffnete Testkit und dessen Inhalt kann bei 2-8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum aufbewahrt werden! \*

- **Reagens 1 \*\*:**  
Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, wenn keinerlei Kontamination vorliegt  
**1:10** mit destilliertem Wasser **verdünnen**. Die für die zu testende Serie notwendige Menge vorbereiten.  
Stabilität nach Verdünnung: 15 Tage bei 2-8°C.

- **Reagens 2a, 2b und 4 :**

Gebrauchsfertig  
Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, wenn keinerlei Kontamination vorliegt

- **Reagens 3a und 3b:**

**Das Reagens 5 Sekunden im Vortex-Mischer homogenisieren.** Danach ist es gebrauchsfertig. Stabilität nach dem Öffnen: 2 Monate bei 2-8°C, wenn keinerlei Kontamination vorliegt.

**Hinweise:** \* Der Testkit darf nicht eingefroren werden.

\*\* Vorhandene Kristalle wirken sich nicht auf die Reagensqualität aus. Bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle inkubieren.

### 7 ENTNAHME UND BEARBEITUNG DER PROBE

#### 7.1 Entnahme:

- Hydrophobe Entnahmeröhren (Kunststoff oder silikonhaltiges Glas) verwenden.
- Antikoagulationsmittel: EDTA (K<sub>3</sub>).

#### 7.2 Aufbewahrung der Probe:

- Die Probe muss innerhalb von **8 Stunden** nach der Entnahme behandelt werden, um einen Abfall der CD55- und CD59-Antigenexpression zu vermeiden.
- Sie muss bei Raumtemperatur (18-25°C) aufbewahrt werden.
- Die Probe nicht einfrieren

### 8 Verfahren

Hinweis: Um gute Ergebnisse zu erzielen, sollte beim Pipettieren von kleinen Volumina darauf geachtet werden, dass die Reagenzien direkt auf den Röhrenboden pipettiert werden. Für die Durchführung des Tests müssen alle Reagenzien **Raumtemperatur** besitzen.

Für jede zu testende Probenreihe muß eine α- und β-Beadpräparation mitgeführt werden. Eine Testreihe kann bis zu 6 Proben umfassen.

**Als Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung einer Normalprobe und einer bekannten PNH-Probe parallel zu jeder zu testenden Probenreihe**

#### 8.1 Vorbereitung der Probe:

- Ein 15 ml Kunststoffröhren mit T0 beschriften
- Nach Homogenisierung der Blutprobe, **10 µl** Vollblut in das Röhren T0 pipettieren.
- **1,5 ml** verdünntes Reagens 1 hinzufügen.
- Das Röhren **5 Sekunden** auf dem Vortex-Mischer durchmischen.

#### 8.2 Vorbereitung der α- und β- Beads:

- 2 Kunststoffröhren mit T1 und T2 beschriften
- Die Reagenzien 3a und 3b mit dem Vortex-Mischer resuspendieren.
- Röhren T1: **40 µl** des Reagens 3a (α-Beads) pipettieren.
- Röhren T2: **40 µl** des Reagens 3b (β-Beads) pipettieren.

#### 8.3 Immunomarkierung der Proben:

- 2 Kunststoffröhren mit T2 und T3 beschriften.

In jedes der Röhren T3 und T4:

- **20µl** der verdünnten Probe aus dem Röhren T0 pipettieren.

**Hinweis: Röhrenöffnung und Röhreninnenwand müssen unbedingt von sämtlichen Probentropfen gereinigt werden, um jede Kontaminationsgefahr zu vermeiden, die zu verfälschten Ergebnissen führen könnte.**

- **20 µl** des Reagens 2a (monoklonaler anti-CD55 Antikörper) in das Röhren T3 pipettieren.
- **20 µl** des Reagens 2b (monoklonaler anti-CD59 Antikörper) in das Röhren T4 pipettieren.
- Die 2 Röhren **2 Sekunden** auf dem Vortex-Mischer durchmischen
- **8-12 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.

### 8.4 Nachweis:

In jedes der Röhrcchen T1 bis T4:

- 20 µl des Reagens 4 (Nachweisreagens) pipettieren
- Die 4 Röhrcchen 2 Sekunden auf dem Vortex-Mischer durchmischen.
- 8-12 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 2 ml des verdünnten Reagens 1 in jedes Röhrcchen T1, T2, T3 und T4 pipettieren

Die so vorbereiteten Proben können vor der durchflußzytometrischen Messung 4 Stunden lang bei 2-8°C aufbewahrt werden

### 8.5 Durchflußzytometrische Analyse:

Für die Analyse der Messung ist das Anwendungsprotokoll des Herstellers des verwendeten Durchflußzytometers zu berücksichtigen.

Für die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wird der geometrische Mittelwert (Mn (x) oder GeoMean (je nach Durchflußzytometer) herangezogen.

Vor der Analyse wird jedes Röhrcchen auf dem Vortex-Mischer homogenisiert

**Der Test erfordert die Analyse von 10000 Granulozyten (oder Beads) pro Röhrcchen.**

- **Analyse der α- und β-Beads: Röhrcchen T1 und T2 (Abb. 1)**

Ein Zytogramm FS LOG vs SS LOG erstellen.

Um die Hauptpopulation der singulären α- oder β-Beads ein Analysefenster „A“ zeichnen (Abb. 1a).

Von der im Analysefenster „A“ eingegrenzten Population ein Histogramm FL1 LOG erstellen. Den Fluoreszenzmittelwert (MFI) der α- und β-Beads (Abb. 1b) über das gesamte Histogramm (Abb. 1b und 1c, Markierung „B“ und „E“) ablesen.

**Für optimale Analysebedingungen muss der Peak der β-Beads im Histogramm FL1 in der 3. Dekade liegen. Zu diesem Zweck die Spannung des Fotomultiplikators FL1 entsprechend einstellen.**

Abb. 1a: Zytogramm der α- oder β-Beads

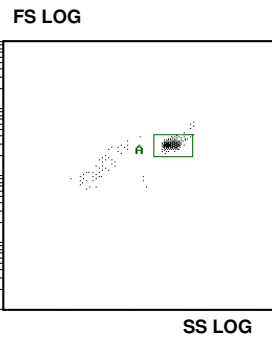


Fig. 1b: Histogramm der β-Beads:

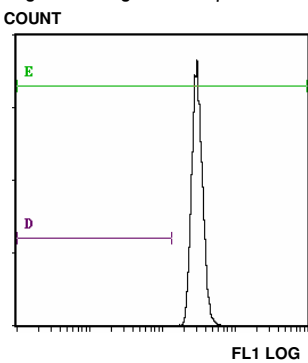
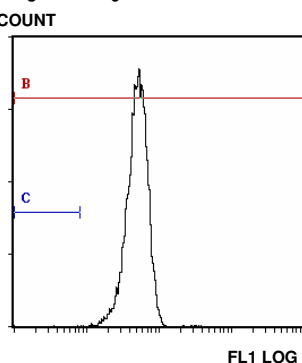


Fig. 1c Histogramm der α-Beads:



- **Positionierung der Auswertungsmarkierungen (Abb. 1b und 1c)**

An jedem FL1 Histogramm (enthält nur die in Fenster „A“ eingegrenzten Beads) werden zwei Markierungen „C“ und „D“ gesetzt, die der zu erwartenden Position der defizienten Zellen entsprechen. Zur Positionierung der Markierungen muß die äußerste linke Seite der Markierung (Min, left) im ersten Kanal und die äußerste rechte Seite der Markierung (Max, right) auf eine Fluoreszenzstärke (Fl) eingestellt sein, die man durch folgende Berechnungsformeln erhält:

$$CD55 ("C") = F\alpha = \alpha \times MFI \text{ der } \alpha\text{-Beads}$$

$$CD59 ("D") = F\beta = \beta \times MFI \text{ der } \beta\text{-Beads}$$

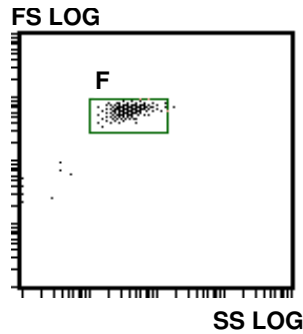
Die Werte α und β sind auf dem im Kit mitgelieferten Kalibrierungsetikett angegeben.

- **Probenanalyse: Röhrcchen T3 (CD55) und T4 (CD59) (Abb. 2)**

Die zuvor festgelegten Fluoreszenzeinstellungen FL1 LOG (Spannung des Fotomultiplikators, PMT FL1) nicht ändern

Am Histogramm FS LOG vs SS LOG ein Analysefenster „F“ um die Population der Erythrozyten zeichnen (Abb. 2).

Abb. 2: Positionierung des Analysefensters „F“ um die Erythrozyten



Von den im Analysefenster „F“ eingegrenzten Erythrozyten ein FL1 LOG Histogramm erstellen:

Röhrcchen T3: den Prozentanteil der in der Markierung „C“ liegenden Zellen ablesen.

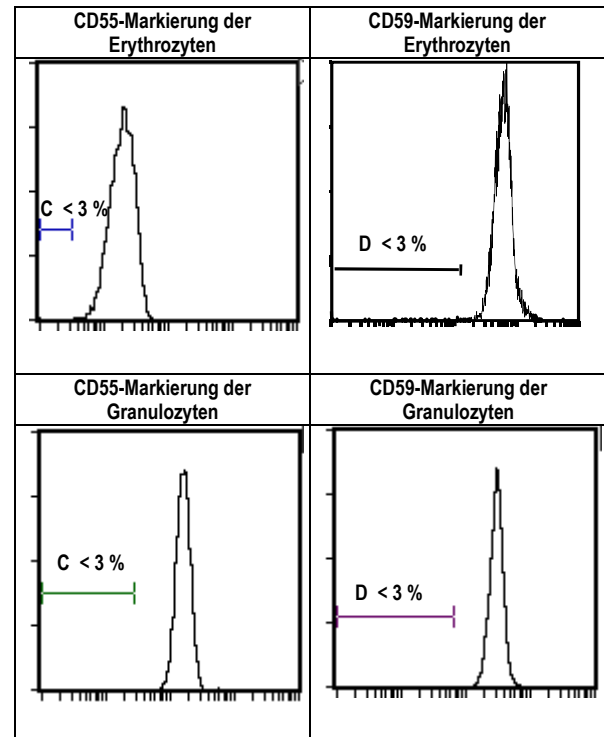
Röhrcchen T4: den Prozentanteil der in der Markierung „D“ liegenden Zellen ablesen.

## 9 ERGEBNISSE UND TESTAUSWERTUNG

Hinweis: Der Test gilt nur für Fluoreszenzstärken, die in linearen Einheiten und nicht in Kanalnummern ausgedrückt werden

Unter den empfohlenen Meßbedingungen enthalten der Cursor „C“ und „D“ bei nicht defizienten Proben nicht mehr als 3 % Zellen

**Beispiel für CD55- und CD59-Markierungen von Granulozyten und Erythrozyten (Normalprobe):**

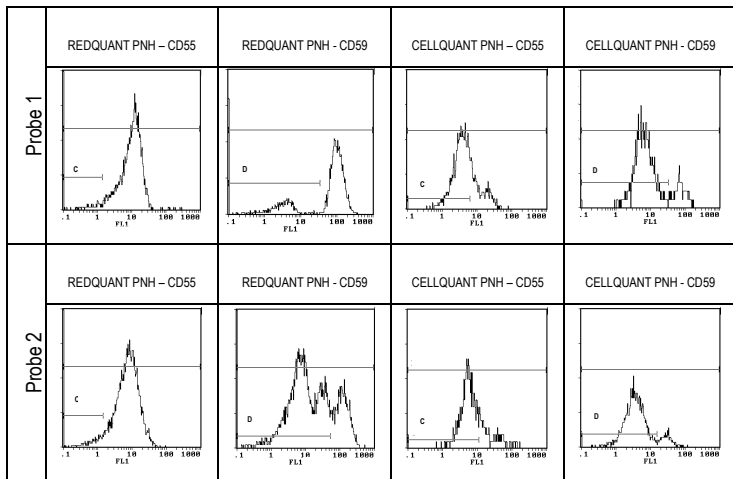


### Testauswertung:

Parameteranzahl > 3 %	REDQUANT PNH		CELLQUANT PNH		Schlussfolgerung
	CD55	CD59	CD55	CD59	
4	> 3 %	> 3 %	> 3 %	> 3 %	<b>PNH</b>
3	> 3 %	> 3 %	> 3 %	< 3 %	<b>PNH</b>
3	> 3 %	> 3 %	< 3 %	> 3 %	<b>PNH</b>
3	< 3 %	> 3 %	> 3 %	> 3 %	<b>PNH</b>
3	> 3 %	< 3 %	> 3 %	> 3 %	<b>PNH</b>
2	> 3 %	> 3 %	< 3 %	< 3 %	<b>PNH</b>
2	< 3 %	< 3 %	> 3 %	> 3 %	<b>PNH</b>
2	< 3 %	> 3 %	< 3 %	> 3 %	Nicht PNH
2	< 3 %	> 3 %	> 3 %	< 3 %	Nicht PNH
2	> 3 %	< 3 %	> 3 %	< 3 %	Nicht PNH
2	> 3 %	< 3 %	< 3 %	> 3 %	Nicht PNH
1	> 3 %	< 3 %	< 3 %	< 3 %	Nicht PNH
1	< 3 %	> 3 %	< 3 %	< 3 %	Nicht PNH
1	< 3 %	< 3 %	> 3 %	< 3 %	Nicht PNH
1	< 3 %	< 3 %	< 3 %	> 3 %	Nicht PNH
0	< 3 %	< 3 %	< 3 %	< 3 %	Normal

- a- Wenn 3 oder 4 Parameter von 4 > 3 % sind, wird die Probe als **PNH** erklärt.
- b- Wenn 2 Parameter CD55 und CD59 bei einer gleichen Population (entweder Granulozyten oder Erythrozyten) > 3 % sind, wird die Probe als **PNH** erklärt.
- c- Wenn 2 Parameter von 4 > 3 % sind (andere als bei Fall b oben) oder 1 Parameter von 4 > 3 % sind, wird die Probe als nicht PNH erklärt. In diesem Fall sollte in kurzem Abstand ein Test zur Bestätigung durchgeführt werden.
- d- Wenn 0 Parameter von 4 > 3 % sind, ist die Probe normal.

### Beispiel für CD55- und CD59-Markierungen an zwei PNH-Proben an Granulozyten und Erythrozyten:



## 10 GRENZEN DES KITS

### 10.1 Mikrozystose:

Proben mit Mikrozystose (rote Blutkörperchen von kleiner Größe) generieren auf künstliche Weise Prozentanteile an defizienten Zellen von > 3%.

### 10.2 Blutübertragung:

Patienten, die kürzlich eine Blutübertragung erhalten haben, können mit dem REDQUANT PNH Kit nicht getestet werden. Da die Blutübertragung einen potenziellen CD55- und/oder CD59-Mangel verdeckt, kann sie ein falsch-negatives Ergebnis liefern (fälschlicherweise als normal eingeschätzte Probe).

## 11 LEISTUNGEN

Der Test wurde auf dem Becton Dickinson Geräte Typ FACSCan und dem Beckman Coulter Typ XL und XL MCL (Software System II) validiert.

### 11.1 Sensitivität (für die kombinierte Verwendung der Kits CELLQUANT PNH und REDQUANT PNH): 100 %

23 PNH-Proben wurden bei der kombinierten Verwendung der Kits CELLQUANT PNH und REDQUANT PNH als PNH bestätigt<sup>(3)</sup>.

### 11.2 Nachweisgrenze:

0 % CD55- und CD59-defiziente Zellen

### 11.3 Messbereich:

Von 0 % bis 24,8 % der CD55-defizienten Zellen.

Von 0 % bis 58 % der CD59-defizienten Zellen

### 11.4 Testwiederholbarkeit:

4 Normalproben wurden 5-mal mit dem gleichen Testkit vermessen.

Alle Messungen ergaben Prozentanteile an CD55- und CD59-defizienten Zellen von unter 3%.

### 11.5 Reproduzierbarkeit innerhalb einer Charge:

Eine Normalprobe wurde mit 6 verschiedenen Testkits einer Charge (gleiche Lotnummer) vermessen. Alle Messungen ergaben Prozentanteile an CD55- und CD59-defizienten Zellen von unter 3%.

## 12 FEHLERURSACHEN

Beobachtetes Problem	Mögliche Ursachen	Mögliche Lösungen
Bei einer Normalprobe erscheint für das Röhrchen CD55 und CD59 (> 3 % defiziente Zellen) eine Markierung, die dem Hintergrundsignal entspricht.	Es wurden 20 µl Vollblut statt 20 µl verdünntem Vollblut verwendet. Die mAk sind nicht mehr im Überschuss vorhanden.	Den Vorgang wiederholen und dabei die Blutprobe verdünnen.
Bei einer Normalprobe erscheint für das Röhrchen CD55 und/oder CD59 (> 3 % defiziente Zellen) eine Markierung, die dem Hintergrundsignal entspricht.	Zugabe der Antikörper-Reagenzien R2a und/oder R2b wurde vergessen	Den Vorgang wiederholen und dabei alle Reagenzien richtig verwenden.
Bei einer Normalprobe wird die gleiche Markierung der Beads und der roten Blutkörperchen beobachtet.	Zugabe des Reagenz R4 wurde vergessen.	Den Vorgang wiederholen und dabei das Reagens richtig verwenden.
Auf dem Histogramm FS vs SS sind nur wenige oder gar keine α- und/oder β-Beads sichtbar.	Schlechte Resuspension der α- und/oder β-Beads	Das Reagens R3a und oder R3b mindestens 5 Sekunden mit dem Vortex-Mischer homogenisieren, bevor es geöffnet und pipettiert wird
Bei einer Normalprobe wird ein Anteil an CD55-defizienten Zellen von über 3 % nachgewiesen, und der CD59-Peak liegt weit von der Markierung „C“ entfernt.	Die Parameter CD55 und CD59 wurden mit der falschen Markierung („C“ oder „D“) ausgewertet.	Die Markierung „C“ dem CD55 und die Markierung „D“ dem CD59 zuteilen

## 13 HAFTUNG

Für die ordnungsgemäße Verwendung im Rahmen der *In-vitro*-Diagnostik sind die Anweisungen in der Anleitung und die kombinierte Verwendung der Kits **CELLQUANT PNH** und **REDQUANT PNH** strikt zu befolgen. Jede Modifizierung oder Änderung sowie eine Verwendung von Reagenzien anderer Serien kann die Testergebnisse beeinflussen. In diesem Fall sind Reklamationen bzw. der Austausch des Produktes ausgeschlossen.

## 14 LITERATURNACHWEIS

- 1- KISHIMOTO T. *et al.*, Leucocyte Typing VI, Garland Publishing Inc, White Cell Differentiation Antigens. 1996, 519-520, 521-522.
- 2- SCHLOSSMAN SF. *et al.*, Leucocyte Typing V, Oxford University Press, White Cell Differentiation Antigens. 1995, 1468-1471.
- 3- OELSCHLAEGEL U. *et al.*, Clin Lab Haem. 2001, 23 : 81-90.

## 15 SYMBOLE

<b>REF</b>	Bestellnummer		Verwendbar bis
<b>IVD</b>	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Temperaturgrenzen	<b>LOT</b>	Chargenbezeichnung
	Hersteller		



140 CH. DE L'ARMEE D'AFRIQUE  
13010 MARSEILLE  
FRANCE  
TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40

FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71  
Version Dezember 2018