

exbio

FagoFlowEx Kit

100 testov | Kat. č. ED7042



Návod na použitie (SK)

Verzia: ED7042_IFU_v8_SK

Dátum vydania: 14-04-2023

Symbole použité na označenie pomôcky

	Diagnostická zdravotnícka pomôcka <i>in vitro</i>		Teplotný limit
	Označenie CE		Uchovávajte mimo slnečného svetla
	Výrobca		Uchovávajte v suchu
	Jedinečný identifikátor pomôcky		Obsah
	Prečítajte si návod na použitie alebo elektronický návod na použitie		Značka UKCA
	Obsah postačuje na <n> testov		
	Katalógové číslo		
	Číslo šarže		
	Dátum trvanlivosti		

1. Účel určenia pomôcky

FagoFlowEx Kit je určený na stanovenie fagocytárnej aktivity neutrofilných granulocytov meraním respiračného (oxidačného) vzplanutia z plnej krvi pomocou prietokovej cytometrie.

Čo se zisťuje a/alebo meria

Pomôcka detekuje a meria dva parametry pomocou fluorogenného substrátu dihydrorodamín 123 (DHR123):

- percento neutrofilných granulocytov, ktoré produkujú reaktívne metabolity kyslíku (ROS) v reakcii na požitie baktérií *E. coli*
- intracelulárnu aktivitu enzýmov zodpovedných za produkciu ROS.

Funkcie pomôcky

Pomôcka je určená na screening/pomoc pri stanovení diagnózy vrodenej alebo získanej imunodeficiencie.

Súvislosť s fyziologickým alebo patologickým stavom

Neschopnosť neutrofilných granulocytov katalyzovať produkciu reaktívnych foriem kyslíku spôsobuje chronickú granulomatóznou chorobu (CGD), skupinu dedičných porúch so spoločným fenotypovým prejavom, závažnými opakujúcimi sa bakteriálnymi a mykotickými infekciami s tvorbou granulómov v tkanivách ^(1, 2, 3, 4). Výsledky, ktoré odpovedajú CGD môžu mať príčinu taktiež v deficite MPO, ktorý je najčastejšou poruchou fagocytov, obvykle s prejavmi normálneho fenotypu bez častejšieho výskytu infekcií ⁽⁵⁾.

Pokles fagocytárnej aktivity bez poruchy enzýmov produkujúcich ROS sprevádza rôzne iné klinické stavy spojené s oslabením imunity, buď primárnu variabilnú imunitnú nedostatočnosť a deficit plazmatických opsonínov, alebo sekundárnu imunitnú nedostatočnosť ^(6, 7).

Typ testu

Nie je automatizovaný

Kvantitatívny

Typ požadovanej vzorky

Vzorka ľudskej antikoagulovanej periférnej plnej krvi

Testovacia populácia

Pacient s podozrením na poruchu funkcie granulocytov

2. Účel použitia

Pomôcka je určená iba na profesionálne použitie v laboratóriu. Pomôcka nie je určená na vyšetrenie v blízkosti pacienta alebo priamo pri pacientovi a nie je určená na sebatestovanie.

Požiadavky na kvalifikáciu

Užívateľ musí mať súčasné odborné znalosti v oblasti prietokovej cytometrie, ovládať štandardné laboratórne techniky, vrátane pipetovania, manipulovať bezpečne a správne so vzorkami z ľudského tela.

Užívateľ musí spĺňať normu EN ISO 15189, prípadne iné národné legislatívne normy.

3. Princíp testu

Test je založený na meraní produkcie ROS v neutrofilných granulocytoch pomocou fluorogenného substrátu DHR123.

Počas testu je vzorka ľudskej krvi zmiešaná s tepelne inaktivovanými baktériami *E. coli* a s DHR123. Pohltenie *E. coli* neutrofilnými granulocytmi sa podporí zahriatím reakčnej zmesi na 37 °C. Počas inkubácie sú baktérie aktívne pohlcované bunkami a pasívne po svojom koncentračnom gradiente do intracelulárneho priestoru vstupuje nefluorescenčný DHR123. Baktérie zostanú zachytené vo vnútri bunkových fagozómov a spustia enzymatické reakcie, ktoré vedú k produkcii ROS. Ionty ROS oxidujú DHR123 na fluorescenčný rodamín 123 (R123), ktorý je excitovaný laserovým lúčom z prietokového cytometru počas akvizície krvnej vzorky. Následná emisia svetla z R123, ktorá je priamo úmerná intracelulárnej aktivite enzýmov produkujúcich ROS, je zachytávaná a analyzovaná prietokovým cytometrom.

Paralelne so stimuláciou *E. coli* sa vykonávajú ďalšie dve reakcie, negatívna kontrolná reakcia, ktorá je reakciou bez *E. coli*, a pozitívna kontrolná reakcie, ktorá bez fagocytózy aktivuje enzýmy k produkcii ROS pomocou forbol 12-myristát 13-acetátu (PMA).

Bunky sú považované za aktívne fagocytujúce ak ich fluorescencia prevyšuje fluorescenciu buniek z reakcie negatívnej kontroly. Výsledok je uvádzaný v percentách fagocytujúcich buniek. Intenzita fluorescencie fagocytujúcich buniek je priamo úmerná intracelulárnej aktivite enzýmov produkujúcich ROS.

4. Poskytované materiály

Obsah

Pomôcka FagoFlowEx Kit vystačí na vykonanie 100 testov a je dodávaná vo formáte:

E. coli (5 fľaštičiek) obsahujúca lyofilizované baktérie *E. coli*, 1 fľaštička stačí na stimuláciu 20 vzoriek krvi (ED7042-1).

DHR123 (5 fľaštičiek) obsahujúca lyofilizovaný DHR123, 1 fľaštička stačí na zafarbenie 60 vzoriek krvi (ED7042-2).

Stimulation Control (5 fľaštičiek) obsahujúca lyofilizovaný PMA, 1 fľaštička je určená na 20 pozitívnych kontrolných testov (ED7042-3).

Lysing Solution (1 fľaša) obsahujúca 15 ml roztoku pripraveného na použitie (ED7042-4).

5. Požadované, ale neposkytované materiály

Testovacie skúmavky s guľatým dnom (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

6. Požadované zariadenia

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (10 – 1000 µl) na pipetovanie vzoriek a činidiel

Vortex

Termostatický inkubátor alebo vodná kúpeľ umožňujúce inkubovať testovacie skúmavky pri 37 °C

Prietokový cytometer vybavený laserovým excitačným zdrojom (488 nm), detektormi pre rozptýlené svetlo, optickými filtermi a emisnými detektormi vhodnými pre zber signálov z fluochromov uvedených v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Spektrálna charakteristika fluochromov použitých v pomôcke

Fluochrom	Excitácia [nm]	Emisia [nm]
Rodamín 123	488	525

POZNÁMKA: Pomôcka bola testovaná na prietokových cytometroch BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) a Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Skladovanie a zaobchádzanie

Skladujte pri teplote 2-8 °C.

Chráňte pred priamym slnečným svetlom.



Nezamrazujte.

Informácie o stabilite po prvom otvorení a dobe použiteľnosti po prvom otvorení, spolu s podmienkami skladovania a stabilitou pracovných roztokov (v prípade potreby) nájdete v časti 10 Postup (Príprava reagencií).

8. Upozornenia, preventívne opatrenia a obmedzenia

GHS klasifikácia nebezpečnosti

VÝSTRAHA: Lysing Solution (ED7042-4) obsahuje formaldehyd (č. 50-00-0) a metanol (č. 67-56-1) v koncentráciách klasifikovaných ako nebezpečné.

Prvky označenia	Signálne slovo
	Nebezpečie
	
H-vety	H302 Škodlivý po požití. H315 Dráždi kožu. H317 Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. H319 Spôsobuje vážne podráždenie očí. H335 Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest. H341 Podozrenie, že spôsobuje genetické poškodenie. H350 Môže spôsobiť rakovinu.
P-vety	P201 Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi. P264 Po manipulácii dôkladne umyte ruky a zasiahnuté časti tela. P280 Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. P301+P312 PO POŽITÍ: Pri zdravotných problémoch, volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára . P302+P352 PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla. P305+P351+P338 PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. P308+P313 Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. P333+P313 Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. P362 Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.

Úplné informácie o rizikách, ktoré predstavujú chemické látky a zmesi obsiahnuté v tomto výrobku a o tom, ako s nimi zachádzať a ako ich likvidovať, nájdete v Bezpečnostnom liste (SDS), ktorý je k dispozícii na www.exbio.cz.

Biologické riziko

Ľudské biologické vzorky, krvné vzorky a akékoľvek materiály, ktoré s nimi prichádzajú do kontaktu, sú vždy považované za infekčné.

Používajte osobné ochranné a bezpečnostné pomôcky, aby ste zabránili kontaktu s kožou, očami a sliznicami.

Dodržiňte všetky platné zákony, predpisy a postupy pre manipuláciu a likvidáciu infekčných materiálov.

Prejavy znehodnotenia pomôcky

Normálny vzhľad dodaných lyofilizovaných reagensí je biely prášok (*E. coli* a Stimulačná kontrola) alebo biela pevná hmota (DHR123). Nepoužívajte, pokiaľ pozorujete akúkoľvek zmenu vzhľadu, napr. zmenu farby alebo skupenstva (skvapalnenie).

Normálny vzhľad lyzačného roztoku je číra kvapalina. Nepoužívajte, pokiaľ pozorujete akúkoľvek zmenu vzhľadu, napr. zákal alebo známky precipitácie.

Obmedzenie používania

Nepoužívajte po uplynutí doby použiteľnosti uvedenej na štítkoch výrobku.

9. Vzorka

Použite žilnú periférnu krv odobranú do skúmavky klasifikovanej ako zdravotnícka pomôcka s antikoagulantom heparín.

POZNÁMKA: Antikoagulantia EDTA a citrát negatívne ovplyvňujú výsledky testu.

Vzorka krvi v odberovej skúmavke musí byť skladovaná pri izbovej teplote. Neuchovávajú v chladničke.

Vzorku krvi spracujte najneskôr do 24 hodín od odberu.

10. Postup

Príprava reagensí

E. coli

Rekonstituujte obsah fľaštičky s *E. coli* v 250 µl deionizovanej vody. Pripravujte čerstvé každý deň merania, skladujte pri 2-8 °C a spotrebujte do 8 hodín. Prípadne možno reagensiu zmraziť na -20 °C až -80 °C a použiť do 7 dní.

UPOZORNENIE: Vyvarujte sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

DHR123

Rekonstituujte obsah fľaštičky DHR123 v 650 µl deionizovanej vody. Pripravujte čerstvé každý deň merania, skladujte pri 2-8 °C a spotrebujte do 8 hodín. Prípadne možno reagenziu zmraziť na -20 °C až -80 °C a použiť do 7 dní.

POZNÁMKA: Reagenzie vydržia až 5 cyklov zmrazenia a rozmrazenia.

Stimulation control

Rekonstituujte obsah fľaštičky Stimulation control v 250 µl deionizovanej vody. Pripravujte čerstvé každý deň merania, skladujte pri 2-8 °C a spotrebujte do 8 hodín. Prípadne možno reagenziu zmraziť na -20 °C až -80 °C a použiť do 7 dní.

POZNÁMKA: Reagenzie vydržia až 5 cyklov zmrazenia a rozmrazenia.

Lysing Solution

Reagencia je pripravená k použitiu.

POZNÁMKA: Pred použitím vytemperujte reagenziu na izbovú teplotu.

Značenie vzoriek

1. Pre vyšetrenie jedného pacienta označte tri skúmavky s guľatým dnom 12 x 75 mm príslušnou identifikáciou vzorky a označením

E. coli stimulovaná reakcia,

pozitívna kontrolná reakcia (stimulácia PMA)

a negatívna kontrolná reakcia.

Pipetujte na dno skúmaviek

- 10 µl E. coli do skúmavky označenej ako E. coli stimulovaná reakcia.
 - 10 µl Stimulation Control do skúmavky označenej ako pozitívna kontrolná reakcia.
 - Do skúmavky označenej ako negatívna kontrolná reakcia nepipetujte nič.
2. Pipetujte 50 µl dobre premiešanej krvnej vzorky na dno každej zo skúmaviek a jemne vortexujte.

UPOZORNENIE: Vyvarujte se pipetovaniu krvi na stenu skúmavky. Pokiaľ sa stopy alebo kvapky krvi zachytia na stene skúmavky, nemusia byť zafarbené reageniou alebo nemusí dôjsť k lýze erytrocytov a výsledok testu nemusí byť platný.

3. Pridajte 10 µl DHR123 na dno každej zo skúmaviek a jemne vortexujte.
4. Umiestnite skúmavky do 37 °C na 20 min do vodného kúpeľa alebo na 30 min

do termostatického inkubátoru.

5. Pridajte 50 µl lyzačného roztoku do každej zo skúmaviek. Jemne vortexujte a inkubujte skúmavky po dobu 5 minút pri izbovej teplote v tme.
6. Pridajte 1 ml deionizovanej vody do každej zo skúmaviek, jemne vortexujte a inkubujte 10 minút pri izbovej teplote v tme.
7. Zafarbenú vzorku ihneď merajte prietokovým cytometrom. V prípade, že zafarbená vzorka nebude okamžite zmeraná, uchovávajte v tme pri 2-8 °C a analyzujte do 2 hodín.

UPOZORNENIE: Fluorescencia rodamínu 123, vzniknutého oxidáciou DHR123, je detekovaná v kanáli FITC (525 nm). Rodamín 123 sa z granulocytov rýchlo uvoľňuje, ako je ukázané na obrázku 8, preto treba **zmerať vzorky čo najskôr** (nejeskôr 2 hodiny od lýzy), najlepšie **v štandardizovanom úzkom časovom okne** (viď strana 18).

UPOZORNENIE: Bezprostredne pred akvizíciou prietokovým cytometrom vzorku vortexujte, aby sa zabránilo tvorbe agregátov.

Analýza prietokovým cytometrom

Prietokový cytometer vybraný k použitiu s pomôckou FagoFlowEx Kit musí byť rutinne kalibrovaný pomocou fluorescenčných mikroguličiek podľa pokynov výrobcu cytometru, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.

Pri nesprávnej údržbe môže prietokový cytometer poskytovať falošné výsledky.

V sekcii 6 Požadované zariadenia sú uvedené potrebné špecifikácie cytometru pre lasery a fluorescenčné detektory podľa excitačných a emisných charakteristík fluorochromov.

Pred analýzou zafarbenej vzorky nastavte napätie na požadovaných fluorescenčných detektoroch. Napätie na fotonásobiči by malo byť nastavené dostatočne vysoko, aby minimum negatívnych udalostí bolo zaznamenané v nultom kanáli na ose fluorescencie. Napätie na fotonásobiči by taktiež nemalo prekročiť hodnoty, pri ktorých sú pozitívne udalosti natlačené k pravej ose.

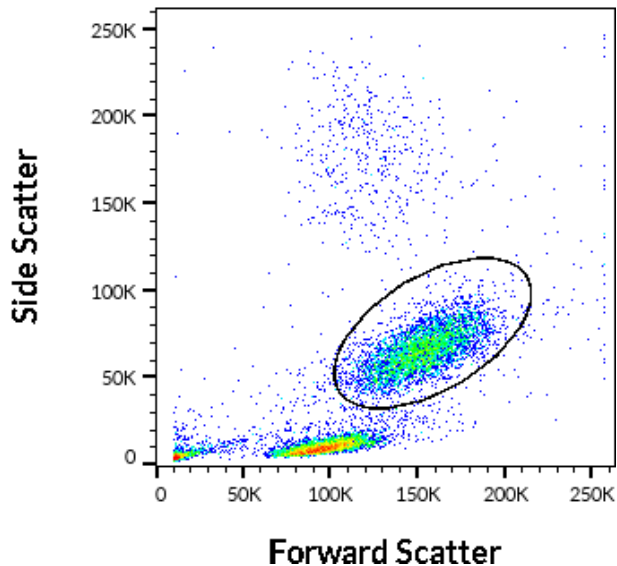
Pre analýzu nameraných dát je možné použiť software vyvinutý výrobcom cytometru alebo software určený pre offline analýzu cytometrických dát (napr. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analýza patientskej vzorky

Zmerajte minimálne 5 000-10 000 leukocytov. Namerané dáta zobrazte v grafe side-scatter (SSC) verzus forward scatter (FSC). Ohraničte populáciu granulocytov, ako je znázornené na obrázku 1.

UPOZORNENIE: Pozícia granulocytov sa v grafe SSC-FSC kvôli pohlteniu baktérií mení, preto upravte nastavenie ohraničujúceho regiónu individuálne pre každú reakciu.

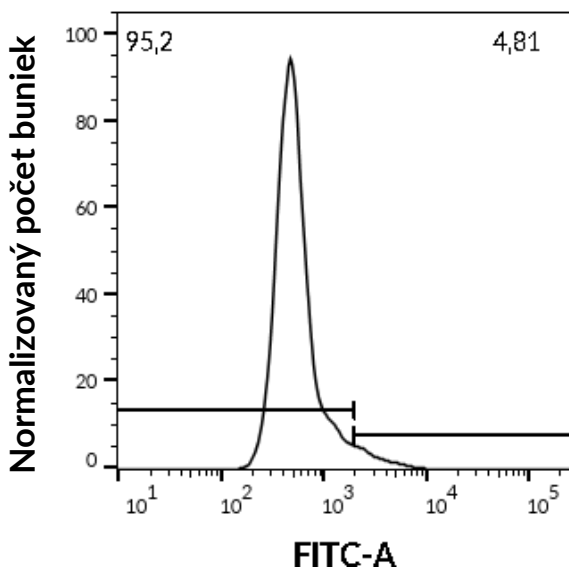
Obrázok 1 Ohraničenie populácie granulocytov



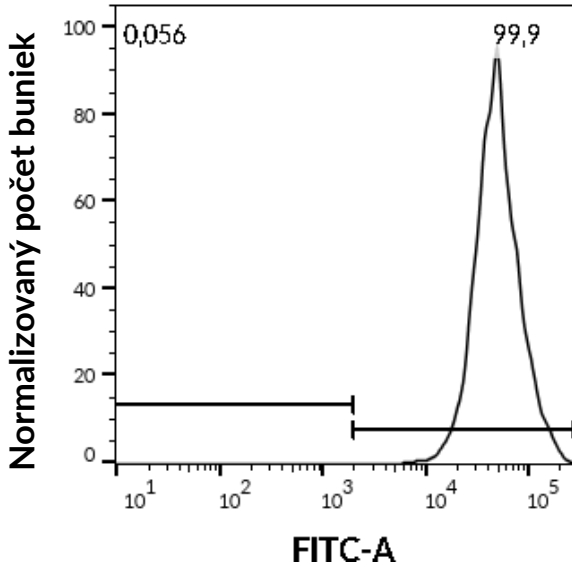
Zobrazte ohraničené granulocyty ako histogram, kde na ose X bude vynesená intenzita fluorescence v kanáli pre FITC. Použite negatívnu kontrolnú reakcie pre nastavenie hranice rozdeľujúcej pozitívne (aktívne fagocytujúce bunky produkujúce ROS) a negatívne (nefagocytujúce bunky neprodukujúce ROS) granulocyty. Skopírujte rozdelenie hranice do histogramov z E. coli stimulovanej reakcie a do histogramu z pozitívnej kontrolnej reakcie (obrázok 2a, 2b, 2c).

Granulocyty, u ktorých prebehlo oxidačné vzplanutie, budú vykazovať jasnú fluorescenciu rodamínu 123. Vypočítajte strednú hodnotu intenzity fluorescence pozitívnych a negatívnych granulocytov. Intenzita fluorescence je priamo úmerná intracelulárnej aktivite enzýmov produkujúcich ROS.

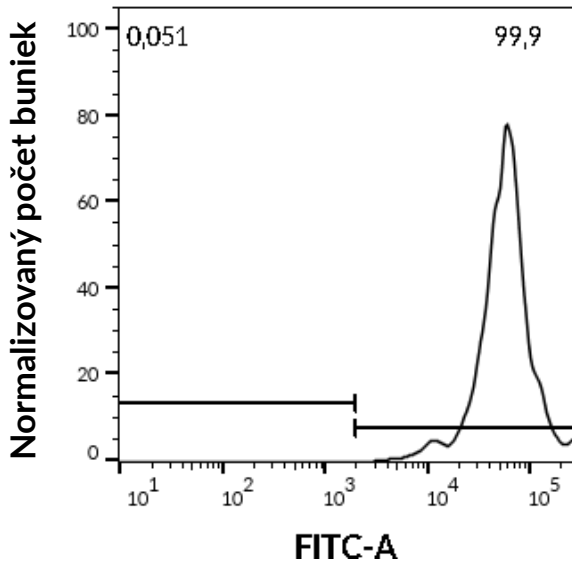
Obrázok 2a Histogram intenzity fluorescence granulocytov z negatívnej kontrolnej reakcie



Obrázok 2b Histogram intenzity fluorescencie granulocytov z E. coli stimulovanej reakcie



Obrázok 2c Histogram intenzity fluorescencie granulocytov z pozitívnej kontrolnej reakcie



Výpočet a interpretácia analytických výsledkov

Kvantitatívne parametre

Výsledkom testu sú dva kvantitatívne parametre, ktoré sú interpretované s ohľadom na to, či bol detekovaný defekt v fagocytárnej aktivite alebo defekt v produkcii ROS:

a) Relatívny počet pozitívnych granulocytov, ktoré vykazovali respiračné vzplanutie po stimulácii E. coli.

b) Stimulačný index (SI) vypočítaný ako pomer strednej hodnoty fluorescence (MFI) pozitívnych granulocytov z reakcie stimulovanej E. coli a negatívnych granulocytov z negatívnej kontrolnej reakcie.

Príklad výpočtu Stimulačného Indexu

Tabuľka 2 Negatívna kontrolná reakcia: MFI negatívnych a pozitívnych granulocytov

Populácia	Počet (%)	Priemer FITC-A
negatívne	95,2	550
pozitívne	4,81	3995

Tabuľka 3 E. coli stimulovaná reakcia: MFI negatívnych a pozitívnych granulocytov

Populácia	Počet (%)	Priemer FITC-A
negatívne	0,056	1224
pozitívne	99,9	53836

Strednú hodnotu intenzity fluorescence pozitívnych granulocytov z reakcie stimulovanej E. coli (v tabuľke 3) vydajte strednou hodnotou intenzity fluorescence negatívnych granulocytov z negatívnej kontrolnej reakcie (v tabuľke 2).

$$\frac{\text{MFI pozitívnych granulocytov z reakcie stimulovanej E.coli}}{\text{MFI negatívnych granulocytov z negatívnej kontrolnej reakcie}} =$$

$$\frac{53836}{550} = \text{SI (Stimulačný Index)} = 98$$

Kvalitatívne parametre

Kvalitatívna interpretácia dát zahŕňa preloženie viacerých histogramov cez seba s cieľom hodnotiť distribúciu signálu a identifikovať jednotlivé vrcholy rozdelenia, ktoré v prípade výskytu viacerých granulocytárných populácií je nutné analyzovať samostatne.

V prípade **defektu respiračného vzplanutia** (nedostatok oxidácie DHR123) budú výsledné histogramy granulocytov vykazovať zhodu distribúcie signálu medzi reakciou stimulovanou E. coli a pozitívnou kontrolnou reakciou (obrázok 4, 5, 6).

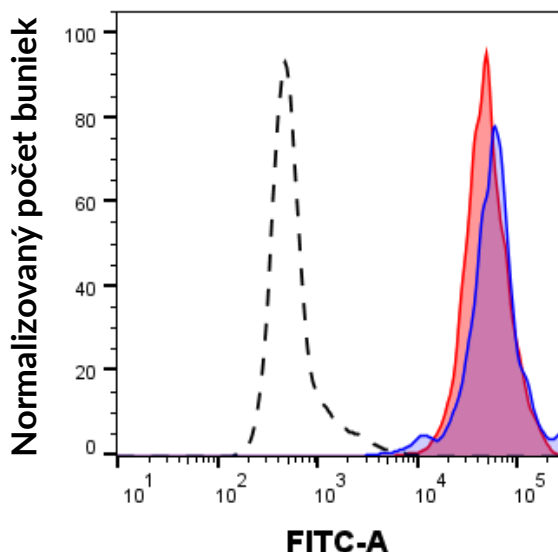
V prípade **defektov fagocytárnej aktivity** (znížené pohlcovanie častíc) budú výsledné histogramy granulocytov ukazovať nezrovnalosti v distribúcii signálu medzi reakciou stimulovanou E. coli a pozitívnou kontrolnou reakciou. Reakcia stimulovaná E. coli bude mať populáciu granulocytov rozdelenú do viacerých vrcholov s rôznou intenzitou fluorescencie a pozitívna kontrolná reakcia bude ukazovať jednovrcholové rozdelenie (obrázok 7).

UPOZORNENIE: Detekcia abnormálnych výsledkov naznačuje iba podozrenie na ochorenie, ktoré je treba potvrdiť ďalšími testami.

Normálny výsledok zdravého darca

Granulocyty vykazujú vysokú úroveň respiračného vzplanutia v reakcii stimulovanej E. coli aj v pozitívnej kontrolnej reakcii (obrázok 3).

Obrázok 3 Prekrytie histogramov: Zdravý darca bez defektu respiračného vzplanutia (SI = 98, relatívny počet pozitívnych granulocytov 99,9 %). Distribúcia signálu v detektore FITC pre granulocyty stimulované *E. coli* (červená výplň), granulocyty z negatívnej kontrolnej reakcie (čierna prerušovaná čiara) a granulocyty z pozitívnej kontrolnej reakcie (modrá výplň).



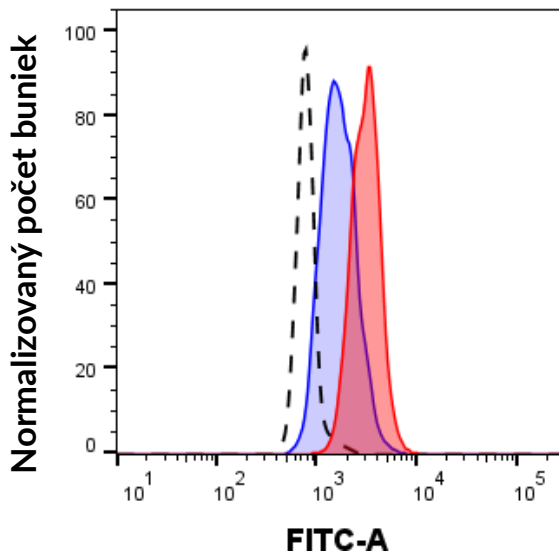
Výsledky ukazujúce na defekt respiračného vzplanutia

1) Jednovrcholové rozdelenie s nízkou intenzitou signálu

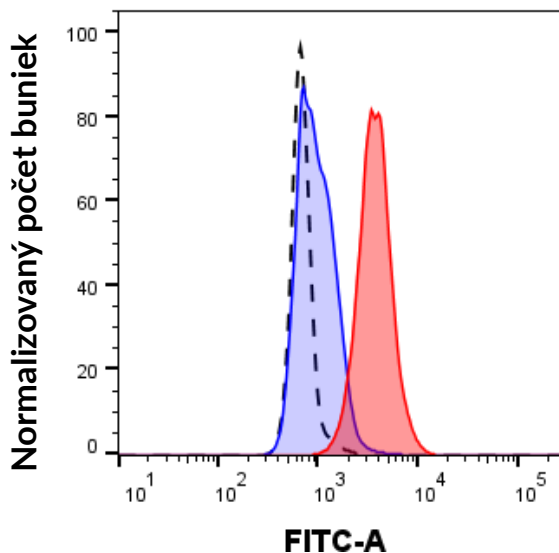
Pokiaľ granulocyty vykazujú nízku úroveň respiračného vzplanutia po *E. coli* stimulácii aj v pozitívnej kontrolnej reakcii, ukazuje to buď na **deficit myeloperoxidázy (MPO)** (obrázok 4), alebo menej často na **chronickú granulomatóznú chorobu (CGD)** (obrázok 5). Intenzita respiračného vzplanutia u CGD závisí na mutácii enzýmového komplexu NADPH oxidázy. Existuje päť autozomálne recesívnych typov (1-5) a jeden X-viazaný recesívny typ tohto ochorenia.

UPOZORNENIE: Test nedokáže rozlíšiť deficit medzi CGD a MPO.

Obrázok 4 Prekrytie histogramov: Pacient s deficitom MPO, (SI = 11, relatívny počet pozitívnych granulocytov 89,7 %). Distribúcia signálu v detektore FITC pre granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negatívnej kontrolnej reakcie (čierna prerušovaná čiara) a granulocyty z pozitívnej kontrolnej reakcie (modrá výplň).



Obrázok 5 Prekrytie histogramov: Pacient muž s X-viazanou formou CGD, (SI = 16, relatívny počet pozitívnych granulocytov 99 %). Distribúcia signálu v detektore FITC pre granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negatívnej kontrolnej reakcie (čierna prerušovaná čiara) a granulocyty z pozitívnej kontrolnej reakcie (modrá výplň).

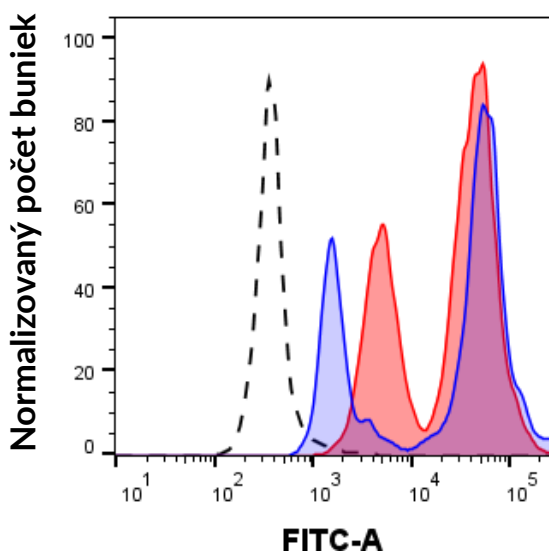


2) Dvojvrcholové rozdelenie s rôznou intenzitou signálu

Pokiaľ v reakcii stimulovanej E. coli aj v pozitívnej kontrolnej reakcii vykazujú granulocyty od pacientky **dve subpopulácie** s odlišnou intenzitou respiračného vzplanutia (obrázok 6), znamená to, že pacientka je prenášačkou X viazanej formy CGD.

UPOZORNENIE: Tri a viac vrcholov v histograme poukazuje na kontamináciu populácie granulocytov pri ohraničení v grafe SSC vs. FSC (obrázok 1) inou subpopuláciou (monocyty) alebo mŕtvymi nefagocytujúcimi bunkami.

Obrázok 6 Prekrytie histogramov: Žena nesúca mutáciu na chromozóme X v géne NADPH oxidázy. Dve subpopulácie granulocytov sa líšia intenzitou respiračného vzplanutia (nízky vrchol MFI SI = 14, relatívny počet granulocytov 35 %, vysoký vrchol MFI SI = 125, relatívny počet granulocytov 65 %). Distribúcia signálu v detektore FITC pre granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negatívnej kontrolnej reakcie (čierna prerušovaná čiara) a granulocyty z pozitívnej kontrolnej reakcie (modrá výplň).

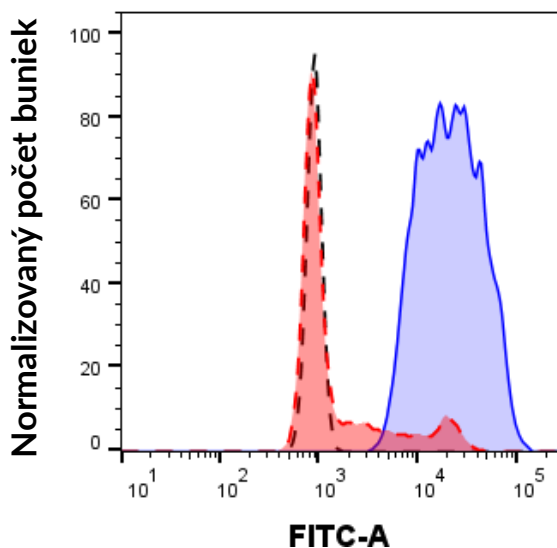


Výsledky ukazujúce na poruchu fagocytárnej aktivity

Odlišné distribučné rozdelenie medzi reakciou stimulovanou E. coli a pozitívnou kontrolnou reakciou.

Pokiaľ granulocyty stimulované E. coli vykazujú nízku úroveň respiračného vzplanutia a granulocyty stimulované v pozitívnej kontrolnej reakcii vykazujú vysokú úroveň respiračného vzplanutia (obrázok 7), ukazuje to na poruchu fagocytárnej aktivity granulocytov, prípadne, že sa jedná o vzorku krvi, ktorá obsahuje antikoagulant EDTA alebo citrát alebo vzorku starú alebo nesprávne skladovanú.

Obrázok 7 Prekrytie histogramov: Vzorka antikoagulovaná EDTA, (nízky MFI vrchol SI = 1, relatívny počet granulocytov 73 %, vysoký MFI vrchol SI = 25, relatívny počet 9 %). Distribúcia signálu v detektore FITC pre granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negatívnej kontrolnej reakcie (čierna prerušovaná čiara) a granulocyty z pozitívnej kontrolnej reakcie (modrá výplň).



11. Vlastnosti analytickej funkcie

Presnosť (opakovateľnosť a reprodukovateľnosť)

Reprodukovateľnosť testu bola stanovená z dát získaných piatimi operátormi analyzujúcimi šesť krvných vzoriek zdravých darcov krvi v rovnaký deň za rovnakých experimentálnych podmienok.

Z dát boli vypočítané nasledujúce parametre:

a) Pre stanovenie relatívneho počtu pozitívnych granulocytov

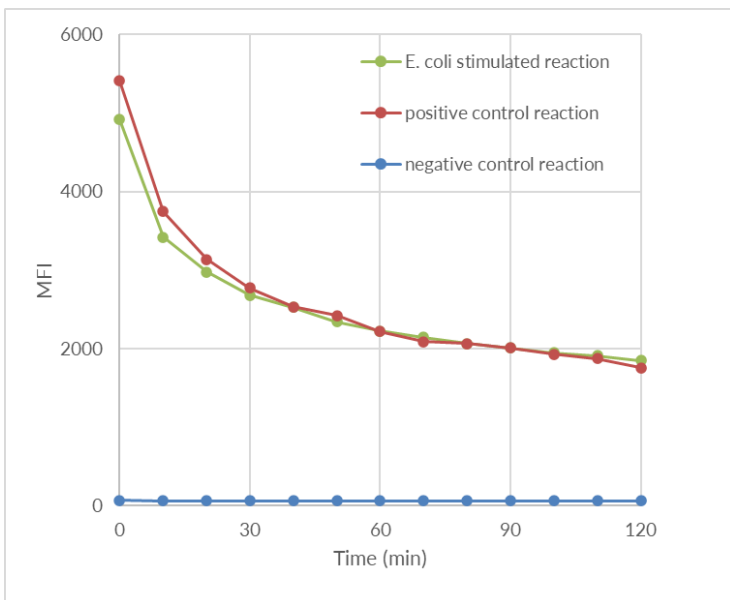
CV = 2 %

b) Pre stanovenie stimulačného indexu

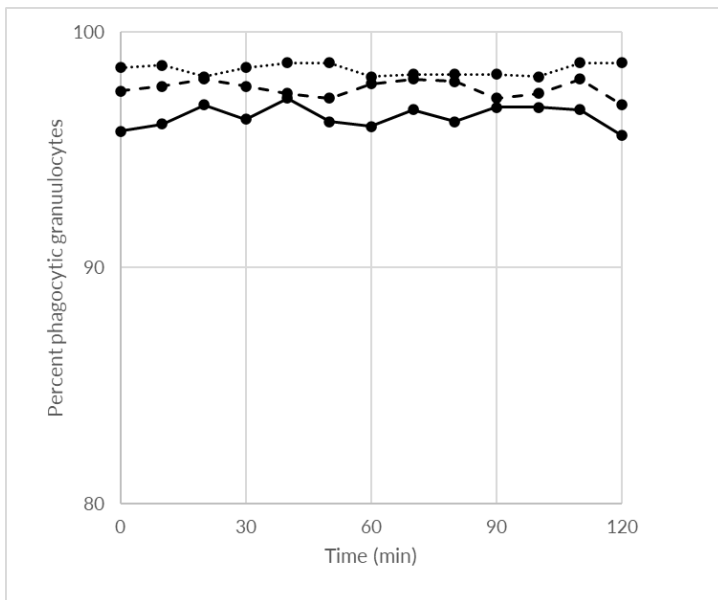
CV = 11 %

Opakovateľnosť testu nebola vykonaná. Vzhľadom k dynamike zmien v MFI spojených s uvoľňovaním R123 z buniek (obrázok 8, 9, 10) by hodnoty opakovateľnosti boli ovplyvnené dobou, ktorá uplynula medzi ukončením spracovania vzorky (fixácia/lýza červených krviniek) a jej analýzou pomocou cytometru. Doporučujeme vykonávať analýzu vzoriek v malých sériách a merať ich v štandardizovanom úzkom časovom okne. Prípadne analyzovať väčšie série vzorkov s časovým odstupom, napr. po dlhšom časovom odstupe (40 minút), ktorý minimalizuje variabilitu v MFI.

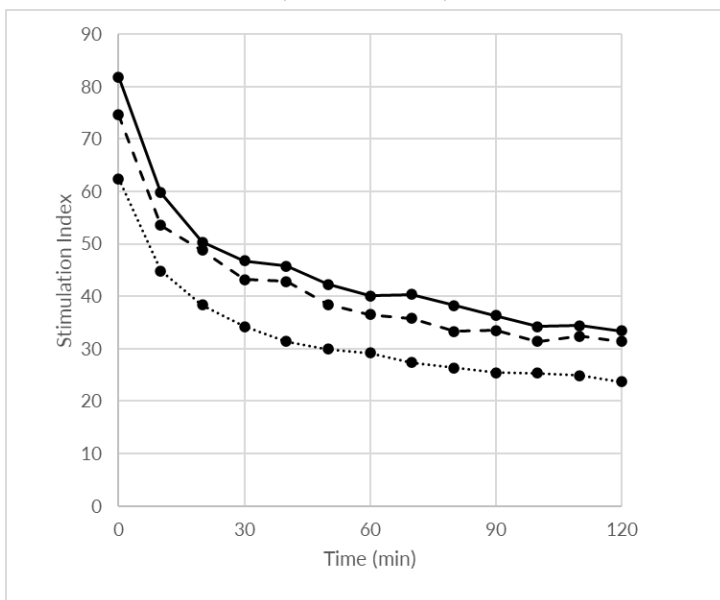
Obrázok 8 Stredná hodnota intenzity fluorescence granulocytov v čase po lýze červených krviniek, ukázaná jedna vzorka krvi ako príklad (zdravý darca).



Obrázok 9 Fagocytárna aktivita granulocytov (%) v čase po lýze červených krviniek, 3 rôzne krvné vzorky (zdraví darcovia).



Obrázok 10 Stimulačný Index v čase po lýze červených krviniek, 3 rôzne krvné vzorky (zdraví darcovia).



12. Vlastnosti klinickej funkcie

Pomôcka bola hodnotená porovnávacím meraním s testom PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) s použitím vzoriek od celkom 47 pacientov (tabuľka 4). Oba kity boli schopné detekovať: a) zlyhanie ingescie častíc (nízka fagocytárna aktivita) aj b) poruchy oxidatívneho vzplanutia (deficit MPO, CGD) so 100% citlivosťou a 100% špecificitou.

Tabuľka 4 Charakteristika súboru pacientov v štúdiu funkčnej spôsobilosti

Popis patientskej vzorky	n
Zdravý darca (nesúvisiaca imunologická porucha)	40
CGD (2 chorí a jedna prenášačka)	3
MPO deficit	2
Nízka fagocytárna aktivita (model ochorenia - EDTA antikoagulant)	2
Staré vzorky (opakované merania zdravých darcov za 48 hodín)	4

13. Očakávané hodnoty

Referenčné intervaly pre respiračné vzplanutie granulocytov boli stanovené na 40 vzorkách periférnej krvi zdravých darcov.

- Počet granulocytov s respiračným vzplanutím

90–100 %

- Stimulačný index granulocytov > 30

3. percentil = 31

Medián = 56

97. percentil = 97

Pretože sa stimulačný index môže v rôznych laboratóriách a na rôznych prístrojoch líšiť, MUSÍ si každé laboratórium stanoviť vlastné rozmedzie normálnych hodnôt pomocou vlastných testovacích podmienok na vzorkách od miestnej populácie zdravých darcov.

14. Interferujúce látky a obmedzenia

Antikoagulant EDTA a citrát negatívne ovplyvňujú výsledky testu.

15. Odkazy

- 1) Dinauer MC. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;89-95. doi: 10.1182/asheducation-2005.1.89. PMID: 16304364.
- 2) de Oliveira-Junior EB, et al. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol*. 2011 May;73(5):420-7. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02501.x. PMID: 21204900.
- 3) Song E, et al. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *Clin Mol Allergy*. 2011 May 31;9(1):10. doi: 10.1186/1476-7961-9-10. PMID: 21624140; PMCID: PMC3128843.
- 4) Kuijpers T, et al. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Jan;69(1):7-15. doi: 10.1007/s00018-011-0834-z. Epub 2011 Nov 15. PMID: 22083605; PMCID: PMC3249194.
- 5) Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):598-625. doi: 10.1189/jlb.1204697. Epub 2005 Feb 2. PMID: 15689384.
- 6) Rotrosen D, et al. Disorders of phagocyte function. *Annu Rev Immunol*. 1987;5:127-50. doi: 10.1146/annurev.iy.05.040187.001015. PMID: 3297103.
- 7) Donabedian, H. (1989). Congenital and Acquired Neutrophil Abnormalities. In: Klempner, M.S., Styrut, B., Ho, J. (eds) *Phagocytes and Disease*. Immunology And Medicine Series, vol 11. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1279-3_6

16. Ochranné známky

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ a FlowJo™ sú registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson and Company, Sysmex™ je registrovaná ochranná známka firmy Sysmex Corporation, VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L..

17. História revízií

Verzia 8, ED7042_IFU_v8

Usporiadanie návodu na použitie bolo zmenené.

18. Výrobca

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

Kontaktné informácie

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

19. Splnomocnený zástupca

N/A

POZNÁMKA: Akákoľvek vážna udalosť, ktorá se vyskytla v súvislosti s pomôckou, musí byť oznámená výrobcovi a miestnemu príslušnému úradu.