

exbio

FagoFlowEx Kit

100 Tests | Kat. Nr. ED7042



Gebrauchsanweisung (DE)

Version: ED7042_IFU_v8_DE

Ausgabedatum: 14-04-2023

In der Gerätekennzeichnung verwendete Symbole

	Medizinisches Produkt für die In-vitro-Diagnose		Temperaturgrenze
	CE-Kennzeichnung		Von Sonneneinstrahlung fernhalten
	Hersteller		Vor Feuchtigkeit schützen
	Eindeutige Gerätekennung		Inhalt
	Gebrauchsanweisung beachten		UKCA-Zeichen
	Ausreichend für <n> Tests		Gibt den autorisierten Vertreter in der Schweiz an
	Katalognummer		
	Chargencode		
	Verfallsdatum		

1. Verwendungszweck

Das FagoFlowEx Kit ist für die Bestimmung der phagozytischen Aktivität von neutrophilen Granulozyten durch Messung des respiratorischen (oxidativen) Bursts im Vollblut mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Was wird nachgewiesen und/oder gemessen?

Das Gerät erkennt und misst zwei Parameter mithilfe des fluorogenen Substrats Dihydrodrhodamin 123:

- Anteil der neutrophilen Granulozyten, die als Reaktion auf die Aufnahme von E.-coli-Bakterien reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren
- intrazelluläre Aktivität von ROS-produzierenden Enzymen

Funktion des Produkts

Das Gerät ist für das Screening bzw. die Unterstützung der Diagnose von angeborenen oder erworbenen Immundefekten bestimmt.

Kontext eines physiologischen oder pathologischen Zustands

Durch die Unfähigkeit neutrophiler Granulozyten, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu katalysieren, entsteht die Chronische Granulomatose (CGD), eine Gruppe von Erbkrankheiten mit einem gemeinsamen Phänotyp von wiederkehrenden schweren bakteriellen und Pilzinfektionen und der Bildung von Granulomen im Gewebe^(1, 2, 3, 4). Die Ergebnisse, die auf CGD hindeuten, können auch auf einen MPO-Mangel zurückzuführen sein. MPO ist der häufigste Phagozytendefekt, der sich in der Regel als normaler Phänotyp ohne erhöhte Infektionshäufigkeit zeigt⁽⁵⁾.

Eine Abnahme der phagozytischen Aktivität ohne Defekt der ROS-produzierenden Enzyme tritt bei verschiedenen anderen Erkrankungen auf, die mit einer Immunsuppression einhergehen, entweder bei primären variablen Immundefekten und Plasma-Opsonin-Mängeln oder bei sekundären Immundefekten^(6, 7).

Art des Tests

Nicht automatisiert

Quantitativ

Art der benötigten Probe

Menschliches mit Heparin antikoaguliertes Vollblut

Testpopulation

Ein Patient mit Verdacht auf Störung der Granulozytenfunktion

2. Vorgesehener Benutzer

Das Gerät ist nur für den professionellen Einsatz im Labor bestimmt. Nicht für patientennahe Tests oder Selbsttests geeignet.

Anforderungen an die Qualifikation

Der vorgesehene Benutzer muss über aktuelle Fachkenntnisse in der Durchflusszytometrie-Analyse menschlicher Zellen, standardmäßige Labortechniken, einschließlich Pipettieren, sowie den sicheren und korrekten Umgang mit Proben aus dem menschlichen Körper verfügen.

Der vorgesehene Benutzer muss die Norm EN ISO 15189 oder ggf. andere nationale Normen einhalten.

3. Testprinzip

Der Test basiert auf der Messung der ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten mithilfe eines fluorogenen Substrats Dihydrorhodamin 123 (DHR123).

Bei dem Test wird eine Probe menschlichen Blutes mit hitzeinaktivierten *E.-coli*-Bakterien und mit DHR123 inkubiert. Die Reaktionsmischung wird auf 37 °C gebracht, um die Phagozytose von *E. coli* durch neutrophile Granulozyten zu fördern. Während der Inkubation werden die Bakterien aktiv von den Zellen verschlungen, während nicht fluoreszierendes DHR123 durch seinen Konzentrationsgradienten passiv in die intrazelluläre Umgebung gelangt. Die Bakterien werden in den Phagosomen der Zellen eingeschlossen und lösen enzymatische Reaktionen aus, die zur Bildung von ROS führen. ROS-Ionen oxidieren DHR123 zu fluoreszierendem Rhodamin 123 (R123), das durch den Laserstrahl eines Durchflusszytometers bei der Messung einer Blutprobe angeregt wird. Die anschließende Lichtemission von R123, die der intrazellulären Aktivität der ROS-produzierenden Enzyme entspricht, wird mit einem Durchflusszytometer erfasst und ausgewertet.

Gleichzeitig mit der Stimulation mit *E. coli* werden zwei weitere Reaktionen durchgeführt: die Negativkontrollreaktion, d. h. die Reaktion ohne *E. coli*, und die Positivkontrollreaktion, bei der Phorbol 12-Myristat 13-Acetat verwendet wird, das die ROS-produzierenden Enzyme ohne Phagozytose aktiviert.

Die Zellen gelten als aktiv phagozytierend, wenn ihre Fluoreszenz diejenige der Zellen aus der negativen Kontrollreaktion übersteigt. Das Ergebnis wird als Prozentsatz der phagozytierenden Zellen berichtet. Die Fluoreszenzintensität von phagozytierenden Zellen ist direkt proportional zur intrazellulären Aktivität der ROS-produzierenden Enzyme.

4. Bereitgestellte Reagenzien

Inhalt

Das FagoFlowEx Kit, das 100 Tests umfasst, wird mit den folgenden Reagenzien geliefert:

E. coli (5 Fläschchen) mit gefriergetrockneten *E.-coli*-Bakterien, 1 Fläschchen ist für

die Stimulation von 20 Blutproben ausreichend (ED7042-1)

DHR123 (5 Fläschchen) mit lyophilisiertem Dihydrorhodamin 123, 1 Fläschchen ist für die Färbung von 60 Blutproben ausreichend (ED7042-2)

Stimulationskontrolle (5 Fläschchen) mit lyophilisiertem PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat), 1 Fläschchen ist für 20 positive Kontrolltests bestimmt (ED7042-3)

Lyselösung (1 Flasche) mit 15 ml gebrauchsfertiger Lösung (ED7042-4)

5. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Einmal-Teströhrchen mit 12 × 75 mm und Rundboden

Deionisiertes Wasser (Reagenzienqualität)

6. Erforderliche Ausrüstung

Automatische Pipette mit Einwegspitzen (10 – 1000 µl) zum Pipettieren der Proben und Reagenzien

Vortex-Mixer

Thermostat (Luftinkubator) oder Wasserbad, um Reagenzgläser bei 37 °C zu inkubieren

Die Laseranregungsquelle des Durchflusszytometers (488 nm), die Detektoren für Streuungen, die optischen Filter und der Emissionsdetektor sind für die Erfassung des Fluorochromsignals geeignet (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Spektrumscharakteristik der in dem Gerät verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Anregung [nm]	Emission [nm]
Rhodamin 123	488	525

HINWEIS: Das Gerät wurde auf folgenden Durchflusszytometern getestet: BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) und Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Lagerung und Handhabung

Bei 2–8 °C aufbewahren.

Längere Lichteinwirkung vermeiden.

Nicht einfrieren.



Informationen zur Stabilität beim Gebrauch und zur Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen sowie zu den Lagerungsbedingungen und der Stabilität von

Arbeitslösungen (falls zutreffend) sind in Abschnitt 10 „Vorgehensweise (Reagenzienvorbereitung)“ zu finden.

8. Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen bei der Anwendung

GHS-Gefahrenklassifizierung

WARNHINWEIS: Lyselösung (ED7042-4) mit Formaldehyd (CAS-Nr. 50-00-0) und Methanol (CAS-Nr. 67-56-1) in als gefährlich eingestuften Konzentrationen

Angaben auf dem Etikett	Signalwort
	<p>Gefahr</p>
	
<p>H-Sätze</p>	<p>H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H315 Verursacht Hautreizungen. H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H319 Verursacht schwere Augenreizung. H335 Kann die Atemwege reizen. H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. H350 Kann Krebs erzeugen.</p>
<p>P-Sätze</p>	<p>P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P264 Nach Gebrauch Hände und freiliegende Körperteile gründlich waschen. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. P302+P352 IF BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat</p>

	<p>einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.</p> <p>P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.</p> <p>P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.</p>
--	---

Beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheet/SDS) auf der Produktseite auf www.exbio.cz. Dort finden Sie alle Informationen zu den Risiken, die von den im Produkt enthaltenen chemischen Stoffen und Gemischen ausgehen, und dazu, wie diese gehandhabt und entsorgt werden sollten.

Biologisches Risiko

Menschliche biologische Proben und Blutproben sowie alle damit in Kontakt kommenden Materialien werden immer als infektiöses Material betrachtet.

Verwenden Sie eine persönliche Schutz- und Sicherheitsausrüstung, um den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten zu vermeiden.

Befolgen Sie alle geltenden Gesetze, Vorschriften und Verfahren für den Umgang mit und die Entsorgung von infektiösem Material.

Anzeichen von Verfall

Die mitgelieferten gefriergetrockneten Reagenzien sind normalerweise ein weißes Pulver (E. coli und Stimulationkontrolle) oder ein fester gefriergetrockneter Kuchen (DHR123). Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls Sie eine Veränderung des Aussehens beobachten, z. B. eine Farbänderung oder Verflüssigung.

Die mitgelieferte Lyselösung ist normalerweise eine klare Flüssigkeit. Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls Sie eine Veränderung des Aussehens beobachten, z. B. Trübungen oder Anzeichen von Ausfällungen.

Beschränkung der Verwendung

Das Produkt darf nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

9. Probe

Verwenden Sie venöses peripheres Blut, das in einem als medizinisches Produkt klassifizierten Probengefäß mit dem Heparin-Antikoagulans entnommen wurde.

VORSICHT: Die Antikoagulanzen EDTA und Citrat wirken sich negativ auf die Ergebnisse der Analyse aus.

Die Blutprobe im Entnahmeröhrchen muss bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Nicht im Kühlschrank aufbewahren.

Verarbeiten Sie die Blutprobe spätestens 24 Stunden nach der Entnahme.

10. Vorgehensweise

Vorbereitung der mitgelieferten Reagenzien

E. coli

Rekonstituieren Sie den Inhalt des E.-coli-Fläschchens in 250 µl deionisiertem Wasser. Bereiten Sie es an jedem Messtag frisch zu, bewahren Sie es bei 2–8 °C auf und verwenden Sie es innerhalb der nächsten 8 Stunden. Das Reagenz kann alternativ bei –20 °C bis –80 °C eingefroren und innerhalb von 7 Tagen verwendet werden.

VORSICHT: Vermeiden Sie wiederholtes Gefrieren/Auftauen.

DHR123

Rekonstituieren Sie den Inhalt des DHR123-Fläschchens in 650 µl deionisiertem Wasser. Bereiten Sie es an jedem Messtag frisch zu, bewahren Sie es bei 2–8 °C auf und verwenden Sie es innerhalb der nächsten 8 Stunden. Das Reagenz kann alternativ bei –20 °C bis –80 °C eingefroren und innerhalb von 7 Tagen verwendet werden.

HINWEIS: Die aliquotierte Lösung hält bis zu 5 Gefrier-/Auftauzyklen stand.

Stimulationskontrolle

Rekonstituieren Sie den Inhalt der Stimulationskontrolle in 250 µl deionisiertem Wasser. Bereiten Sie es an jedem Messtag frisch zu, bewahren Sie es bei 2–8 °C auf und verwenden Sie es innerhalb der nächsten 8 Stunden. Das Reagenz kann alternativ bei –20 °C bis –80 °C eingefroren und innerhalb von 7 Tagen verwendet werden.

HINWEIS: Die aliquotierte Lösung hält bis zu 5 Gefrier-/Auftauzyklen stand.

Lyselösung

Das Reagenz ist gebrauchsfertig.

HINWEIS: Bringen Sie das Reagenz vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Färbung der Proben

1. Beschriften Sie für die Untersuchung eines Patienten drei 12 x 75 mm große Reagenzgläser mit Rundboden mit der entsprechenden Probenbezeichnung und Markierung für

die mit E. coli stimulierte Reaktion,

die positive Kontrollreaktion (PMA-Stimulation)

und die negative Kontrollreaktion.

Pipettieren Sie auf den Boden der Reagenzgläser

- 10 µl E. coli in das als „mit E. coli stimulierte Reaktion“ markierte Röhrchen und
 - 10 µl der Stimulationskontrolle in das als „Positive Kontrollreaktion“ markierte Röhrchen.
 - Pipettieren Sie nicht den als „Negative Kontrollreaktion“ gekennzeichneten Inhalt in das Röhrchen.
2. Pipettieren Sie 50 µl der gut gemischten Blutprobe auf den Boden der Reagenzgläser und vortexen Sie sie vorsichtig.

VORSICHT: Pipettieren Sie das Blut nicht auf die Seiten des Reagenzglases. Wenn ein Blutausrich oder -tropfen an der Seite des Reagenzglases verbleibt, wird er möglicherweise nicht mit dem Reagenz gefärbt oder die Erythrozyten werden nicht lysiert und das Testergebnis ist unter Umständen nicht gültig.

3. Pipettieren Sie 10 µl von DHR123 auf den Boden der Reagenzgläser und vortexen Sie sie vorsichtig.
4. Stellen Sie die Reagenzgläser für 20 Minuten bei 37 °C in ein Wasserbad oder für 30 Minuten in einen Luftinkubator.
5. Geben Sie 50 µl der Lyselösung in die Reagenzgläser. Vortexen Sie die Reagenzgläser vorsichtig und inkubieren Sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
6. Geben Sie 1 ml entionisiertes Wasser in die Reagenzgläser, vortexen Sie vorsichtig und inkubieren Sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
7. Messen Sie die gefärbte Probe sofort mit dem Durchflusszytometer. Wird die gefärbte Probe nicht sofort gemessen, verschließen Sie das Reagenzglas, lagern Sie sie bei 2–8 °C im Dunkeln und analysieren Sie sie innerhalb von 2 Stunden.

VORSICHT: Die Fluoreszenz von Rhodamin 123, das durch Oxidation von DHR123 entsteht, wird im FITC-Kanal (525 nm) erfasst. Da das Rhodamin 123 schnell aus den Granulozyten freigesetzt wird (siehe Abbildung 8), müssen die Proben **so schnell wie möglich gemessen werden** (spätestens 2 Stunden nach der Lyse), vorzugsweise **in einem standardisierten engen Zeitfenster** (siehe Seite 18).

VORSICHT: Vortexen Sie die gefärbte Probe unmittelbar vor der Messung auf dem Durchflusszytometer, um Ansammlungen zu vermeiden.

Durchflusszytometrie-Analyse

Das für die Verwendung mit dem FagoFlowEx Kit ausgewählte Durchflusszytometer muss routinemäßig mit fluoreszierenden Mikrokügelchen kalibriert werden, um eine stabile Empfindlichkeit der Detektoren gemäß den

Anweisungen des Herstellers des Zytometers sicherzustellen.

Bei unsachgemäßer Wartung kann das Durchflusszytometer falsche Ergebnisse liefern.

Beachten Sie die Herstellerangaben des Zytometers für Laser und Fluoreszenzdetektoren entsprechend den Anregungs- und Emissionscharakteristiken der Fluorochrome in Abschnitt 6 „Erforderliche Ausrüstung“.

Stellen Sie vor der Analyse der gefärbten Proben die Spannungen an den entsprechenden Fluoreszenzdetektoren ein. Die Spannung am PMT-Detektor sollte ausreichend hoch eingestellt sein, damit möglichst wenige negativ gefärbte Ereignisse den 0. Kanal auf der Fluoreszenzachse stören. Außerdem sollte die Spannung des PMT-Detektors nicht die Werte überschreiten, bei denen positive Ereignisse auf die rechte Achse gedrückt werden.

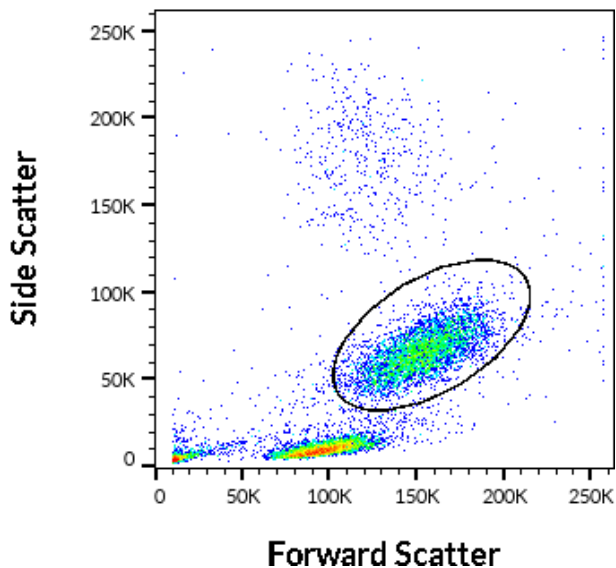
Zur Analyse der Messdaten können die vom Hersteller entwickelte Zytometer-Software oder eine spezielle Software für die Offline-Analyse von Zytometriedaten verwendet werden (z. B. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analyse einer Patientenprobe

Erfassen Sie mindestens 5.000–10.000 Leukozyten-Ereignisse. Stellen Sie die erfassten Ereignisse in einem Punktdiagramm mit Seitenstreuung (SSC) und Vorwärtsstreuung (FSC) grafisch dar. Setzen Sie das Gate um die Granulozyten wie in Abbildung 1 gezeigt.

VORSICHT: Die Aufnahme von Bakterien beeinflusst die Position der Granulozyten im SSC-FSC-Punktdiagramm. Passen Sie daher das Gate für jede Reaktion einzeln an.

Abbildung 1: Abgrenzung der Granulozytenpopulation



Stellen Sie Granulozyten mit Gate als Histogramme dar, wobei die X-Achse die Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal wiedergibt. Verwenden Sie die negative Kontrollreaktion, um ein geeignetes Gate zur Unterscheidung von positiven (aktiv phagozytierende ROS-produzierende Zellen) und negativen (nicht phagozytierende, nicht ROS-produzierende Zellen) Granulozyten zu setzen. Kopieren Sie das Gate in die E.-coli-Stimulationsreaktion und in die positive Kontrollreaktion (Abbildung 2a, 2b, 2c).

Granulozyten, die einen oxidativen Burst durchlaufen, zeigen eine helle Fluoreszenz von Rhodamin 123. Berechnen Sie die mittlere Fluoreszenzintensität der positiven und negativen Granulozyten. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur intrazellulären Aktivität der ROS-produzierenden Enzyme.

Abbildung 2a: Histogramm der Fluoreszenzintensität der Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion

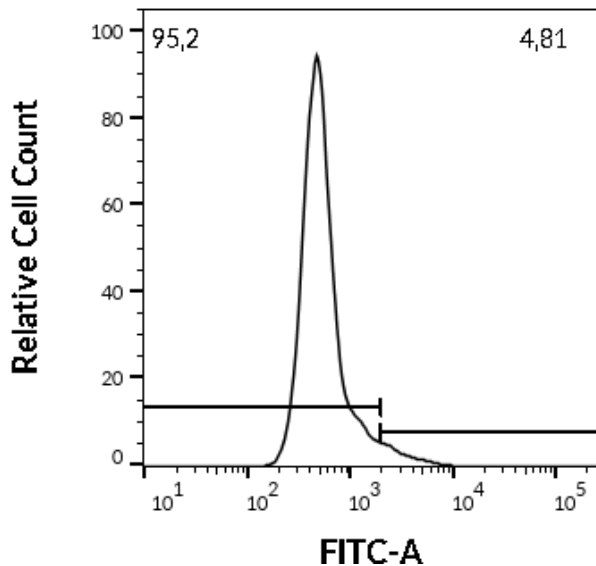


Abbildung 2b: Histogramm der Fluoreszenzintensität der Granulozyten aus der mit E. coli stimulierten Reaktion

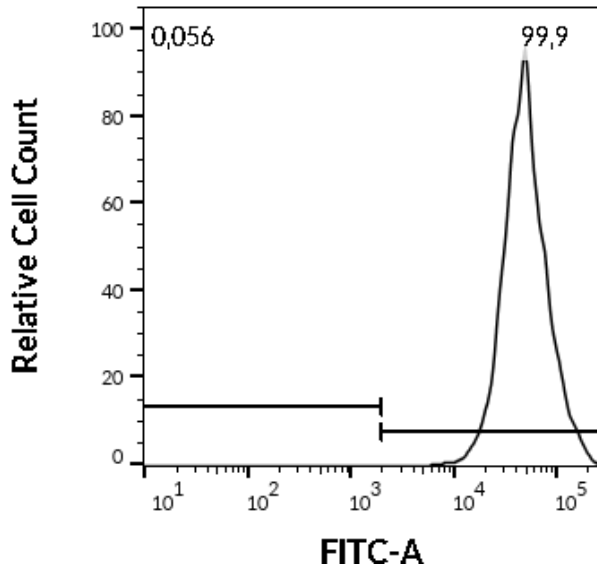
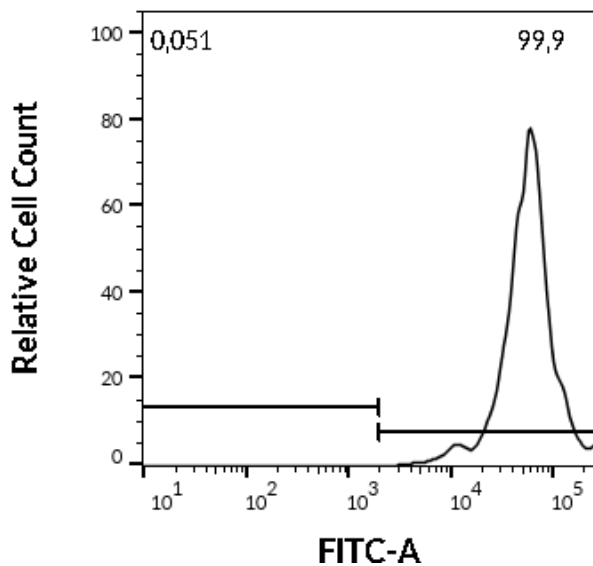


Abbildung 2c: Histogramm der Fluoreszenzintensität der Granulozyten in der positiven Kontrollreaktion



Berechnung und Interpretation von Analyseergebnissen

Quantitative Parameter

Zwei quantitative Parameter werden berichtet und im Hinblick auf Hinweise auf einen Defekt in der phagozytischen Aktivität oder einen Defekt in der ROS-Produktion interpretiert:

a) **relative Anzahl der positiven Granulozyten**, die nach der Stimulation mit *E. coli* einen respiratorischen Burst zeigten

b) **Stimulationsindex (SI)**, berechnet als Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der positiven Granulozyten der mit *E. coli* stimulierten Reaktion und der negativen Granulozyten der negativen Kontrollreaktion

Beispiel für die Berechnung des Stimulationsindex

Tabelle 2: negative Kontrollreaktion: MFI von negativen und positiven Granulozyten

Population	Anzahl (%)	Mittleres FITC-A
negativ	95,2	550
positiv	4,81	3.995

Tabelle 3: mit *E. coli* stimulierte Reaktion: MFI von negativen und positiven Granulozyten

Population	Anzahl (%)	Mittleres FITC-A
negativ	0,056	1.224
positiv	99,9	53.836

Das Verhältnis des MFI-Werts der positiven Granulozyten aus der mit *E. coli* stimulierten Reaktion (in Tabelle 3) wird durch den MFI-Wert der negativen Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion (in Tabelle 2) geteilt.

$$\frac{\text{MFI-Wert der positiven Granulozyten aus der mit E.coli stimulierten Reaktion}}{\text{MFI-Wert der negativen Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion}} = \frac{53836}{550} = \text{SI (Stimulationsindex)} = 98$$

Qualitative Parameter

Die qualitative Dateninterpretation umfasst Histogrammüberlagerungen zur Bewertung der Signalverteilung und zur Identifizierung einzelner Peaks, die bei Auftreten mehrerer Granulozytenpopulationen separat analysiert werden müssen.

Bei **Defekten des respiratorischen Bursts** (fehlende Oxidation von DHR123) zeigen die resultierenden Granulozytenhistogramme eine Übereinstimmung der Signalverteilung zwischen der *E. coli*-Stimulationsreaktion und der positiven Kontrollreaktion (Abbildung 4, 5, 6).

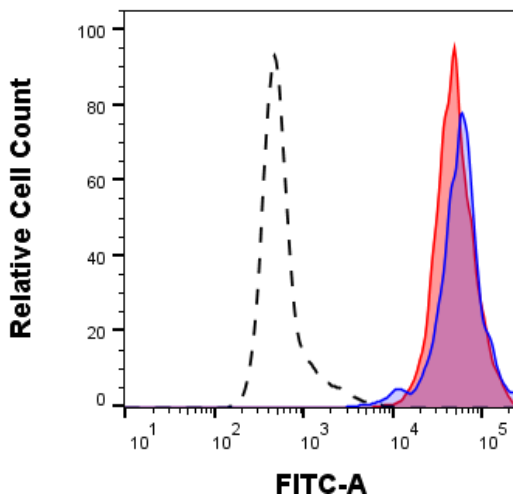
Im Falle von **Defekten der phagozytischen Aktivität** (verminderte Partikelverschlingung) zeigen die resultierenden Granulozytenhistogramme eine Abweichung in der Signalverteilung zwischen der *E. coli*-Stimulationsreaktion und der positiven Kontrollreaktion. Bei der mit *E. coli* stimulierten Reaktion ist die Granulozytenpopulation in mehrere Peaks unterschiedlicher Fluoreszenzintensität unterteilt, während bei der positiven Kontrollreaktion ein einzelner Peak vorliegt (Abbildung 7).

HINWEIS: Der Nachweis ungewöhnlicher Ergebnisse weist nur auf den Verdacht einer Krankheit hin, die durch andere Tests bestätigt werden muss.

Normales Ergebnis eines gesunden Spenders

Granulozyten zeigen einen hohen respiratorischen Burst **sowohl** nach Stimulation mit *E. coli* als auch nach positiver Kontrollreaktion (Abbildung 3).

Abbildung 3: Histogrammüberlagerung: gesunder Spender ohne Defekt des respiratorischen Bursts, (SI = 98, relative Anzahl positiver Granulozyten 99,9 %) Signalverteilung von mit *E. coli* stimulierten Granulozyten (rot gefüllt), Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion (schwarz gestrichelt) und Granulozyten aus der positiven Kontrollreaktion (blau gefüllt) im FITC-Detektor.



Die Ergebnisse weisen auf einen Defekt des respiratorischen Bursts hin

1) Ein einzelner Peak mit geringer Signalintensität

Wenn die Granulozyten **sowohl** nach der Stimulation mit *E. coli* als auch nach der positiven Kontrollreaktion einen geringen respiratorischen Burst aufweisen, deutet dies entweder auf einen **Mangel an Myeloperoxidase (MPO)** (Abbildung 4) oder auf die seltene **Chronische Granulomatose (CGD)** (Abbildung 5) hin. Die Intensität des respiratorischen Bursts bei CGD hängt von der Mutation im NADPH-Oxidase-Enzymkomplex ab. Es gibt fünf autosomal rezessive Typen (1-5) und einen X-chromosomal rezessiven Typ der Krankheit.

VORSICHT: Der Assay kann nicht zwischen CGD und MPO-Mangel unterscheiden.

Abbildung 4: Histogrammüberlagerung: Patient mit MPO-Mangel (SI = 11, relative Anzahl positiver Granulozyten 89,7 %). Signalverteilung von mit *E. coli* stimulierten Granulozyten (rot gefüllt), Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion (schwarz gestrichelt) und Granulozyten aus der positiven Kontrollreaktion (blau gefüllt) im FITC-Detektor.

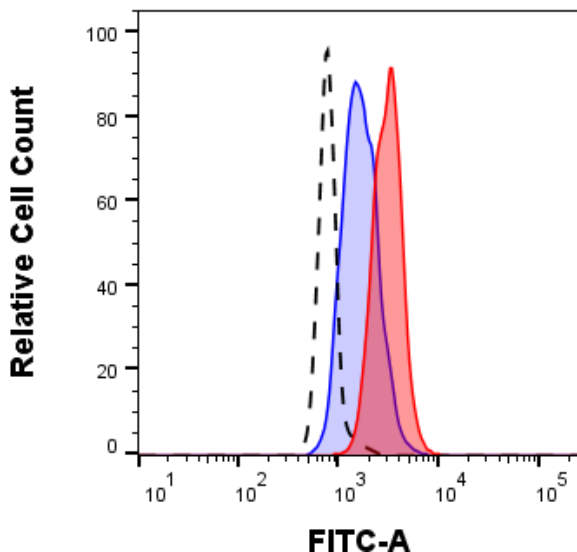
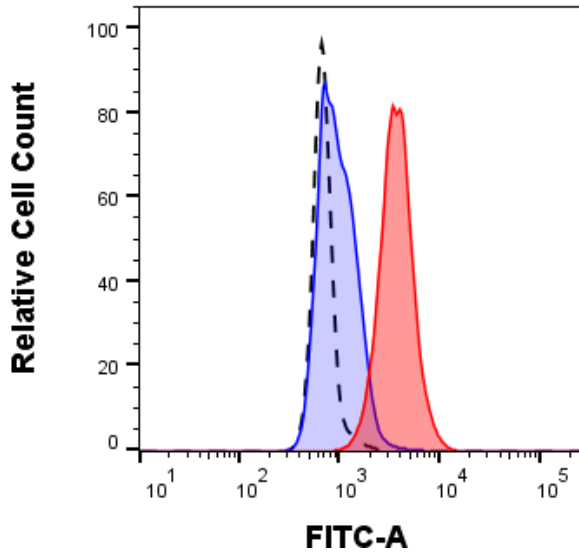


Abbildung 5: Histogrammüberlagerung: Männlicher Patient mit X-chromosomaler CGD, (SI = 16, relative Anzahl positiver Granulozyten 99 %). Signalverteilung von mit E. coli stimulierten Granulozyten (rot gefüllt), Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion (schwarz gestrichelt) und Granulozyten aus der positiven Kontrollreaktion (blau gefüllt) im FITC-Detektor.

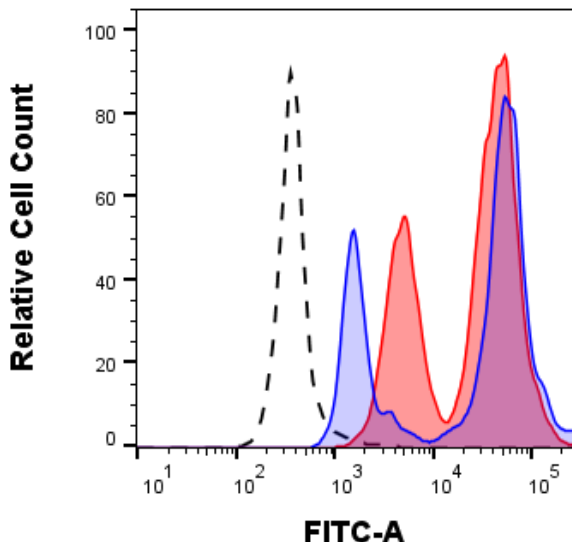


2) Zwei Peaks mit unterschiedlicher Signalintensität

Wenn die Granulozyten einer Patientin **zwei Subpopulationen aufweisen**, die sich in der Intensität des respiratorischen Bursts nach der Stimulation mit *E. coli* und der positiven Kontrollreaktion unterscheiden (Abbildung 6), deutet dies darauf hin, dass die Patientin Trägerin einer X-chromosomalen CGD ist.

VORSICHT: Drei und mehr Peaks im Histogramm deuten auf eine Kontamination der Granulozytenpopulation im SSC vs. FSC Punktdiagramm (Abbildung 1) mit Monozyten oder mit abgestorbenen, nicht phagozytierenden Zellen hin.

Abbildung 6: Histogrammüberlagerung: Frau mit X-chromosomaler Mutation des NADPH-Oxidase-Gens. Zwei Granulozyten-Subpopulationen unterscheiden sich in der Intensität des respiratorischen Bursts (niedriger MFI-Peak SI = 14, relative Anzahl der Granulozyten: 35 %, hoher MFI-Peak SI = 125, relative Anzahl der Granulozyten: 65 %). Signalverteilung von mit *E. coli* stimulierten Granulozyten (rot gefüllt), Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion (schwarz gestrichelt) und Granulozyten aus der positiven Kontrollreaktion (blau gefüllt) im FITC-Detektor.

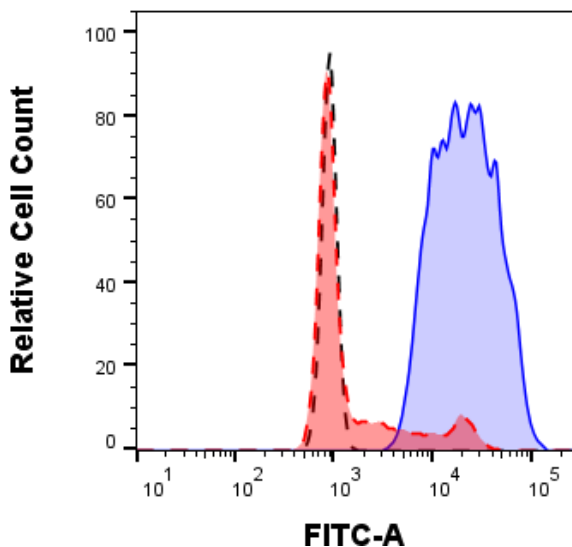


Die Ergebnisse weisen auf einen Defekt der phagozytischen Aktivität hin

Unterschiedliche Peakmuster zwischen der positiven Kontrollreaktion und der mit *E. coli* stimulierten Reaktion

Wenn mit *E. coli* stimulierte Granulozyten einen niedrigen respiratorischen Burst aufweisen und mit einer positiven Kontrollreaktion stimulierte Granulozyten einen hohen respiratorischen Burst zeigen (Abbildung 7), deutet dies auf einen Defekt in der phagozytären Aktivität der Granulozyten hin – oder die Blutprobe enthält das Antikoagulans EDTA oder Citrat oder die Probe war alt oder wurde unsachgemäß gelagert.

Abbildung 7: Histogrammüberlagerung: Mit EDTA antikoagulierte Probe (niedriger MFI-Peak SI = 1, relative Anzahl der Granulozyten: 73 %, hoher MFI-Peak SI = 25, relative Anzahl: 9 %). Signalverteilung von mit *E. coli* stimulierten Granulozyten (rot gefüllt), Granulozyten aus der negativen Kontrollreaktion (schwarz gestrichelt) und Granulozyten aus der positiven Kontrollreaktion (blau gefüllt) im FITC-Detektor.



11. Analytische Leistung

Präzision (Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit)

Die **Reproduzierbarkeit** des Tests wurde anhand von Daten ermittelt, die von fünf Labormitarbeitenden bei der Analyse von sechs Blutproben gesunder Blutspender am gleichen Tag und unter den gleichen Versuchsbedingungen gewonnen wurden.

Die folgenden Parameter wurden berechnet:

a) zur Bestimmung der relativen Anzahl der positiven Granulozyten

CV = 2 %

b) zur Bestimmung des Stimulationsindex

CV = 11 %

Die **Wiederholbarkeit** des Assays wurde nicht festgestellt. Aufgrund der Dynamik der MFI-Änderungen, die mit der Freisetzung von R123 aus den Zellen einhergehen (Abbildung 8, 9, 10), hängen die Werte für die Wiederholbarkeit von der Zeit ab, die zwischen dem Ende der Probenverarbeitung (Fixierung/Lyse der Erythrozyten) und der FACS-Analyse vergangen ist. Es wird empfohlen, eine Reihe kleiner Stichproben zu nehmen und sie innerhalb des standardisierten engen Zeitfensters zu analysieren. Wahlweise können Reihen größerer Stichproben auch später analysiert werden, z. B. nach einem größeren Zeitabstand (40 Minuten), um die MFI-Variabilität zu minimieren.

Abbildung 8: Verlauf der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) der Granulozyten im zeitlichen Verlauf nach Lyse der roten Blutkörperchen am Beispiel einer Blutprobe (gesunder Spender)

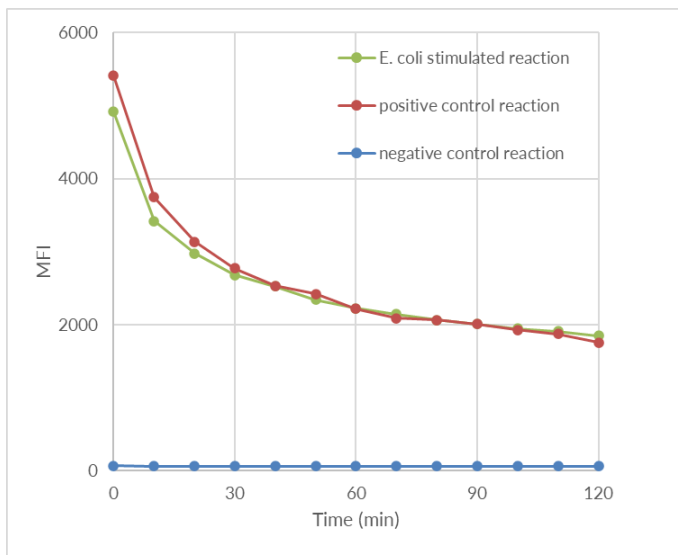


Abbildung 9: Verlauf der phagozytären Aktivität der Granulozyten (%) nach Lyse der roten Blutkörperchen, 3 verschiedene Blutproben (gesunde Spender)

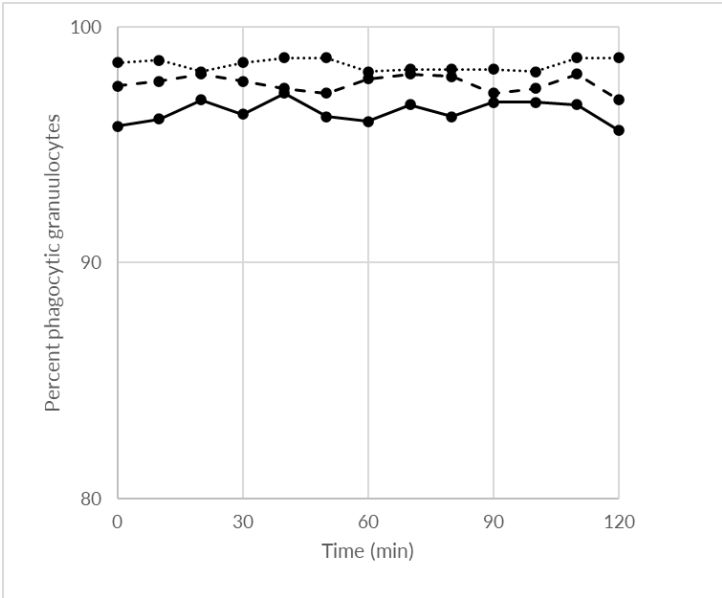
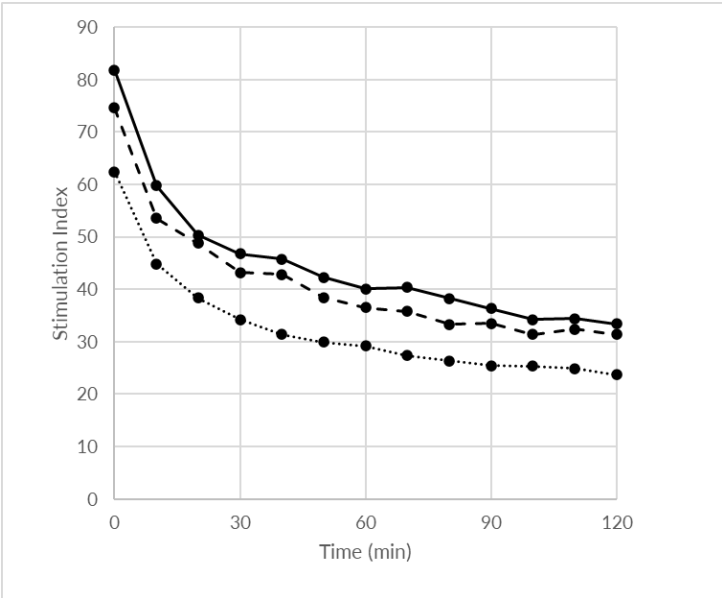


Abbildung 10: Verlauf des Stimulationsindex nach Lyse der roten Blutkörperchen, 3 verschiedene Blutproben (gesunde Spender)



12. Klinische Leistung

Der Assay wurde durch Vergleichsmessungen mit PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) mit Proben von insgesamt 47 Patienten bewertet (Tabelle 4). Beide Kits konnten a) eine fehlende Partikelaufnahme (geringe phagozytische Aktivität) und b) Störungen des oxidativen Bursts (MPO-Mangel, CGD) mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 100 % nachweisen.

Tabelle 4: Patientenmerkmale in der Studie zur Leistungsbewertung

Patientenmerkmale	n
Gesunder Spender (nicht verwandte immunologische Störung)	40
CGD (2 Erkrankte und ein CGD-Träger)	3
MPO-Mangel	2
Geringe phagozytische Aktivität (Krankheitsmodell - EDTA-Antikoagulans)	2
Alte Proben (wiederholte Messungen von gesunden Spendern innerhalb von 48 Stunden)	4

13. Erwartete Werte

Der normale Bereich für die Aktivität des respiratorischen Bursts von Granulozyten wurde in 40 peripheren Blutproben von gesunden Erwachsenen bestimmt.

- Granulozyten mit Aktivität des respiratorischen Bursts
90–100 %
- Stimulationsindex von Granulozyten > 30
3. Perzentil = 31
Median = 56
97. Perzentil = 97

Da der Stimulationsindex je nach Labor und Gerät variieren kann, MUSS jedes Labor den Normalbereich unter seinen eigenen Testbedingungen anhand von Proben aus der lokalen Gruppe gesunder Spender ermitteln.

14. Störende Substanzen und Einschränkungen

Die Antikoagulanzen EDTA und Citrat wirken sich negativ auf die Ergebnisse der Analyse aus.

15. Referenzen

- 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., Styrts, 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. Marken

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ und FlowJo™ sind eingetragene Marken von Becton, Dickinson and Company. Sysmex™ ist eine eingetragene Marke von Sysmex Corporation. VenturiOne® ist eine eingetragene Marke von Applied Cytometry. Infinicyt™ ist eine eingetragene Marke von Cytognos S.L..

17. Revisionsverlauf

Version 8, ED7042_IFU_v8

IFU-Layout geändert.

18. Hersteller

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

Kontaktinformationen

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

19. Autorisierte Vertreter

N/A

HINWEIS: Alle schwerwiegenden Vorfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde vor Ort zu melden.