

exbio

Komplet FagoFlowEx Kit 100 testov | Kat. št. ED7042



Navodila za uporabo (SL)

Različica: ED7042_IFU_v8_SL

Datum izdaje: 14-04-2023

Simboli, uporabljeni na oznakah pripomočka

	In vitro diagnostični medicinski pripomoček		Temperaturne omejitve
	Oznaka skladnosti CE		Ne izpostavljajte sončni svetlobi
	Proizvajalec		Hranite na suhem mestu
	Edinstveni identifikator pripomočka		Vsebina
	Glejte navodila za uporabo		Oznaka UKCA
	Vsebina zadostuje za <n> testov		
	Kataloška številka		
	Koda serije		
	Datum roka uporabnosti		

1. Predvidena uporaba

Pripomoček FagoFlowEx Kit je namenjen določanju fagocitne aktivnosti nevtrofilcev z merjenjem oksidativnega (respiratornega) izbruha v polni krvi s pretočno citometrijo.

Kaj se zaznava in/ali meri

Pripomoček z uporabo fluorogenega substrata dihidrorodamina 123 zaznava in meri dve parametra:

- odstotek nevtrofilcev, ki tvorijo reaktivne kisikove spojine (RKS) kot odziv na zaužitje bakterije *E. coli*,
- znotrajcelično aktivnost encimov, ki tvorijo reaktivne kisikove spojine.

Delovanje pripomočka

Pripomoček je namenjen presejanju/pomoči pri diagnosticiranju prirojene ali pridobljene imunodeficiencie.

Okoliščine fiziološkega ali patološkega stanja

Nezmožnost nevtrofilcev za katalizo tvorbe reaktivnih kisikovih spojin povzroča kronično granulomatozno bolezen (KGB), ki vključuje skupino dednih motenj s skupnim fenotipom ponavljajočih se, hudih bakterijskih in glivičnih okužb ter tvorbe granulomov v tkivih ^(1, 2, 3, 4). Rezultati, ki kažejo na KGB, so lahko prav tako posledica pomanjkanja MPO, ki je najpogostejši fagocitni defekt in se običajno kaže kot normalni fenotip s povečano incidenco okužb ⁽⁵⁾.

Do zmanjšanje fagocitne aktivnosti brez okvare encimov, ki tvorijo reaktivne kisikove spojine, pride pri različnih drugih kliničnih stanjih, povezanih z imunosupresijo, tj. primarnih variabilnih imunskih pomanjkljivostih in pomanjkanju opsonina v plazmi ali sekundarnih imunodeficiencah ^(6, 7).

Vrsta analize

Nesamodejna

Kvantitativna

Vrsta potrebnega vzorca

Človeška polna kri, antikoagulirana s heparinom

Ciljna populacija

Bolnik s sumom na okvaro delovanja granulocitov.

2. Predvideni uporabnik

Pripomoček je namenjen samo profesionalni laboratorijski uporabi. Ni namenjen testiranju v bližini bolnika ali samotestiranje.

Zahteve glede usposobljenosti

Predvideni uporabnik mora imeti posodobljeno znanje o analizi človeških celic s pretočno citometrijo in standardnih laboratorijskih tehnikah, vključno s pipetiranjem ter varnim in pravilnim ravnanjem z vzorci iz človeškega telesa.

Predvideni uporabnik mora delovati skladno s standardom EN ISO 15189 ali drugimi nacionalnimi predpisi, kadar je primerno.

3. Načelo testa

Test temelji na merjenju tvorbe RKS v nevtrofilcih z uporabo fluorogenega substrata dihidrorodamina 123 (DHR123).

Med testom se vzorec človeške krvi inkubira s toplotno inaktivirano bakterijo *E. coli* in DHR123. Reakcijska mešanica se segreje na 37 °C, kar spodbuja fagocitozo *E. coli* z nevtrofilci. Med inkubacijo celice aktivno zajamejo bakterije, medtem ko nefluorescentni DHR123 s svojim gradientom koncentracije pasivno vstopa v znotrajcelično okolje. Celični fagosomi zajamejo bakterije, kar sproži encimske reakcije in posledično tvorbo RKS. Ioni RKS oksidirajo DHR123 na fluorescentni rodamin 123 (R123), ki ga ekscitira laserski žarek iz pretočnega citometra med zajemom krvnega vzorca. Pretočni citometer zbere in analizira posledično oddajanje svetlobe iz R123, ki ustreza znotrajcelični aktivnosti encimov, ki tvorijo RKS.

Sočasno s stimulacijo *E. coli* se izvedeta dve drugi reakciji: negativna kontrola reakcija, ki je reakcija brez *E. coli*, in pozitivna kontrolna reakcija z uporabo s forbol 12-miristat 13-acetatom, ki encime, ki tvorijo RKS, aktivira brez fagocitoze.

Celice so v aktivni fagocitozi, če njihova fluorescenca presega fluorescenco celic pri negativni kontrolni reakciji. Rezultat se poroča kot odstotek fagocitoznih celic. Intenzivnost fluorescence fagocitoznih celic je neposredno sorazmerna z znotrajcelično aktivnostjo encimov, ki tvorijo RKS.

4. Priloženi reagent(i)

Vsebina

Pripomočku FagoFlowEx Kit, ki zadostuje za 100 testov, so priloženi naslednji reagenti:

E. coli (5 vial) z liofiliziranimi bakterijami *E. coli*, 1 viala zadostuje za stimulacijo 20 krvnih vzorcev (ED7042-1).

DHR123 (5 vial) z liofiliziranim dihidrorodaminom 123, 1 viala zadostuje za barvanje 60 krvnih vzorcev (ED7042-2).

Kontrola stimulacije (5 vial) z liofiliziranim PMA (forbol 12-miristat 13-acetat), 1 viala je namenjena za 20 pozitivnih kontrolnih testov (ED7042-3).

Raztopina za liziranje (1 steklenička) s 15 ml raztopine, pripravljene za uporabo

(ED7042-4).

5. Potrebni materiali, ki niso priloženi

Testne epruvete z zaobljenim dnom (12 x 75 mm)

Deionizirana voda (primerna za reagente)

6. Potrebna oprema

Samodejna pipeta s konicami za enkratno uporabo (10 – 1000 µl) za pipetiranje vzorcev in reagentov

Vorteks mešalnik

Termostat (zračni inkubator) ali vodna kopel, v kateri je mogoče inkubirati testne epruvete pri temperaturi 37 °C

Vir ekscitacije za pretočni citometer (488 nm), detektorji za sipanje, optični filtri in detektor emisij, primeren za pridobivanje signala iz fluorokroma iz preglednice 1.

Preglednica 1 Spektralne lastnosti fluorokroma, uporabljenega v pripomočku

Fluorokrom	Ekscitacija [nm]	Emisija [nm]
Rodamin 123	488	525

OPOMBA: Pripomoček so testirali na pretočnih citometrih BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) in Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Shranjevanje in uporaba

Shranjujte pri temperaturi 2–8 °C.

Preprečite daljše izpostavljanje svetlobi.



Ne zamrzujte.

Za informacije o stabilnosti med uporabo in roku uporabnosti po prvem odprtju skupaj s pogoji shranjevanja in stabilnostjo delovnih raztopin (če je primerno) glejte poglavje 10 Postopek (priprava reagentov).

8. Opozorila, previdnostni ukrepi in omejitve uporabe

Klasifikacija nevarnosti GHZ

OPOZORILO: Rastopina za liziranje (ED7042-4) vsebuje formaldehid (CAS št. 50-00-0) in metanol (CAS št. 67-56-1) v koncentraciji, ki je razvrščena kot nevarna.

Elementi oznak	Signalna beseda
	Nevarnost
	
Stavki H	H302 Zdravju škodljivo pri zaužitju. H315 Povzroča draženje kože. H317 Lahko povzroči alergijski odziv kože. H319 Povzroča hudo draženje oči. H335 Lahko povzroči draženje dihalnih poti. H341 Sum povzročitve genetskih okvar. H350 Lahko povzroči raka.
Stavki P	P201 Pred uporabo pridobiti posebna navodila. P264 Po uporabi temeljito umiti roke in izpostavljene dele telesa. P280 Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz. P301 + P312 PRI ZAUŽITJU: ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika. P302 + P352 PRI STIKU S KOŽO: umiti z veliko mila in vode. P305 + P351 + P338 PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. P308 + P313 PRI izpostavljenosti ali sumu izpostavljenosti: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. P333 + P313 Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. P362 + P364 Sleči kontaminirana oblačila. In jih oprati pred ponovno uporabo.

Za celotne informacije o tveganjih zaradi kemičnih snovi in mešanic v izdelku ter načinu ravnanja in odstranjevanja glejte varnostne liste na spletnem mestu izdelka www.exbio.cz.

Biološka nevarnost

Človeške biološke vzorce in krvne vzorce ter vse materiale, ki pridejo v stik z njimi, je treba vedno obravnavati kot kužne materiale.

Uporabite osebno zaščitno in varovalno opremo, da preprečite stik s kožo, očmi in sluznicami.

Upoštevajte vse veljavne zakone, predpise in postopke za odstranjevanje kužnih materialov ter ravnanje z njimi.

Dokaz o poslabšanju

Normalen videz priloženih liofiliziranih reagentov je bel prašek (E. coli in stimulacijska kontrola) ali trdna liofilizirana pogača (DHR123). Reagenta ne uporabite, če opazite kakršno koli spremembo videza, na primer spremembo barve ali utekočinjenje.

Normalen videz raztopine za liziranje je prozorna tekočina. Reagenta ne uporabite, če opazite kakršno koli spremembo videza, na primer motnost ali znaki obarjanja.

Omejitev uporabe

Ne uporabljajte po izteku roka uporabnosti, navedenega na oznakah izdelka.

9. Vzorec

Uporabite vensko periferno kri, odvzeto v vsebnik za vzorce, razvrščen kot medicinski pripomoček, ki vsebuje heparinski antikoagulant.

SVARILO: Antikoagulant EDTA in citrat imata negativen vpliv na rezultate analize.

Krvni vzorec v odvzemni epruveti je treba shranjevati pri sobni temperaturi. Ne shranjujte v hladilniku.

Vzorec krvi obdelajte v največ 24 urah po odvzemu.

10. Postopek

Priprava priloženega(ih) reagenta(ov)

E. coli

Rekonstituirajte vsebino vial *E. coli* v 250 µl deionizirane vode. Sveže pripravite vsak merilni dan, shranjujte pri temperaturi 2-8 °C in uporabite v naslednjih 8 urah. Reagent lahko tudi zamrznete pri temperaturi -20 do -80 °C in uporabite v 7 dneh.

SVARILO: Izognite se ponavljanju ciklov zamrzovanja/odmrzovanja.

DHR123

Rekonstituirajte vsebino vial DHR123 v 650 µl deionizirane vode. Sveže pripravite vsak merilni dan, shranjujte pri temperaturi 2-8 °C in uporabite v naslednjih 8 urah. Reagent lahko tudi zamrznete pri temperaturi -20 do -80 °C in uporabite v 7 dneh.

OPOMBA: Alikvotirana raztopina lahko prestane do 5 ciklov zamrzovanja/odmrzovanja.

Stimulacijska kontrola

Rekonstituirajte vsebino stimulacijske kontrole v 250 µl deionizirane vode. Sveže pripravite vsak merilni dan, shranjujte pri temperaturi 2-8 °C in uporabite v naslednjih 8 urah. Reagent lahko tudi zamrznete pri temperaturi -20 do -80 °C in uporabite v 7 dneh.

OPOMBA: Alikvotirana raztopina lahko prestane do 5 ciklov zamrzovanja/odmrzovanja.

Raztopina za liziranje

Reagent je pripravljen za uporabo.

OPOMBA: Pred uporabo počakajte, da se reagent segreje na sobno temperaturo.

Barvanje vzorcev

1. Pri preiskavi za enega bolnika tri testne epruvete 12 x 75 mm z zaobljenim dnom označite z ustrezno identifikacijo vzorca in oznako za

stimulirano reakcijo E. coli,

pozitivno kontrolno reakcijo (stimulacijo PMA)

in negativno kontrolno reakcijo.

Na dno testnih epruvet pipetirajte

- 10 µl E. coli v epruveto, označeno kot stimulirana reakcija E. coli;
 - 10 µl stimulacijske kontrole v epruveto, označeno kot pozitivna kontrolna reakcija.
 - V epruveto, označeno kot negativna kontrolna reakcija, ne pipetirajte ničesar.
2. Na dno vsake testne epruvete pipetirajte 50 µl dobro premešanega krvnega vzorca in nežno vrtinčite.

SVARILO: Izogibajte se pipetiranju na stene testne epruvete. Če na steni epruvete ostane krvni madež ali kapljica, se morda ne bo barvala z reagentom ali pa se eritrociti ne bodo lizirali, zato rezultat testa ne bo veljaven.

3. Na dno vsake testne epruvete pipetirajte 10 µl DHR123 in nežno vrtinčite.
4. Testne epruvete dajte za 20 minut v vodno kopel pri 37 °C ali 30 minut v zračni inkubator.
5. Vsaki testni epruveti dodajte 50 µl raztopine za liziranje. Testne epruvete nežno vrtinčite in jih inkubirajte 5 minut v temi pri sobni temperaturi.
6. Vsaki testni epruvete dodajte 1 ml dionizirane vode, nežno vrtinčite in inkubirajte 10 minut v temi pri sobni temperaturi.
7. Barvani vzorec takoj zajemite na pretočnem citometru. Če barvanega vzorca ne zajamete takoj, zaprite testno epruveto s pokrovčkom, shranite v temu na temperaturi 2–8 °C in analizirajte v 2 urah.

SVARILO: Fluorescenca rodamina 123, ki nastaja pri oksidaciji reagenta DHR123, se zazna na kanalu FITC (525 nm). Ker se rodamin 123 hitro sprošča iz granulocitov, kot je prikazano na sliki 8, je treba vzorce **izmeriti čim prej** (največ 2 uri po lizi), najbolje v **standardiziranem ozkem časovnem oknu** (glejte stran 18).

SVARILO: Takoj po zajemu na pretočnem citometru vrtinčite barvani vzorce, da preprečite agregate.

Analiza s pretočno citometrijo

Pretočni citometer, izbran za uporabo skupaj s pripomočkom FagoFlowEx Kit, je treba redno kalibrirati z uporabo fluorescentnih mikrokroglic, da se zagotovi stabilna občutljivost detektorjev skladno z navodili proizvajalca citometra.

Če se pretočni citometer ne vzdržuje pravilno, lahko ustvari napačne rezultate.

Glejte specifikacije proizvajalca citometra za laserje in detektorje fluorescence skladno z ekscitacijskimi in emisijskimi lastnostmi fluorokromi v poglavju 6 Potrebna oprema.

Pred analizo barvanega vzorca nastavite napetosti na zadevnih detektorjih fluorescence. Napetost na detektorju PMT je treba nastaviti dovolj visoko, da 0. kanal na fluorescentni osi ovira najmanj negativno barvanih dogodkov. Poleg tega napetost detektorja PMT ne sme preseči vrednosti, pri katerih se pozitivni dogodki vtisnejo v desno os.

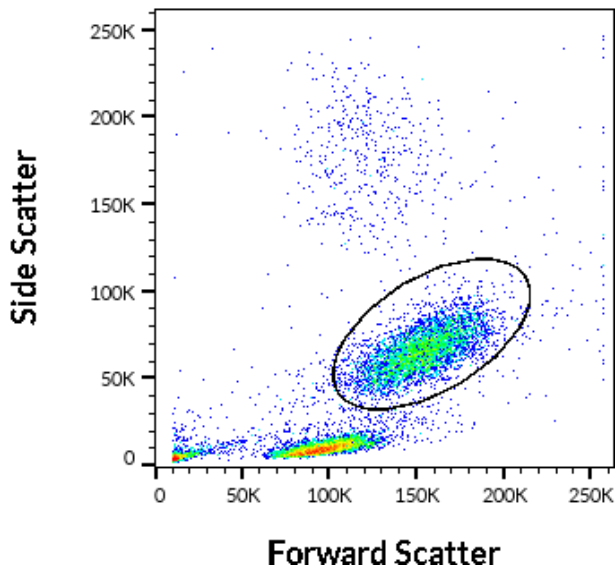
Pri analizi izmerjenih podatkov je mogoče uporabiti programsko opremo citometra, ki jo je razvil proizvajalec, ali programsko opremo, namenjeno podatkovni analizi na citometru brez povezave (na primer FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analiza bolnikovega vzorca

Zajemite najmanj 5000–10.000 levkocitnih dogodkov. Zajete dogodke prikažite na točkovnem diagramu stranskega sipanja (SSC) v primerjavi s prednjim sipanjem (FSC). Zamejite nastavitve okoli granulocitov, kot je prikazano na sliki 1.

SVARILO: Zaužitje bakterij vpliva na položaj granulocitov v točkovnem diagramu SSC-FSC. Zato zamejitev prilagodite ločeno za vsako reakcijo.

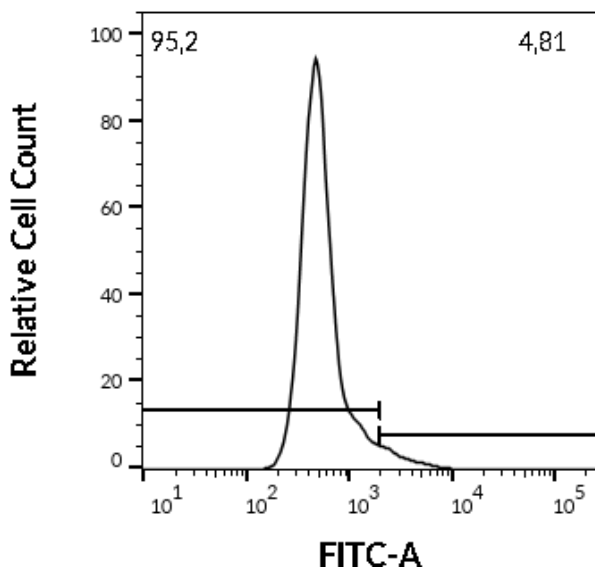
Slika 1 Omejitev populacije granulocitov



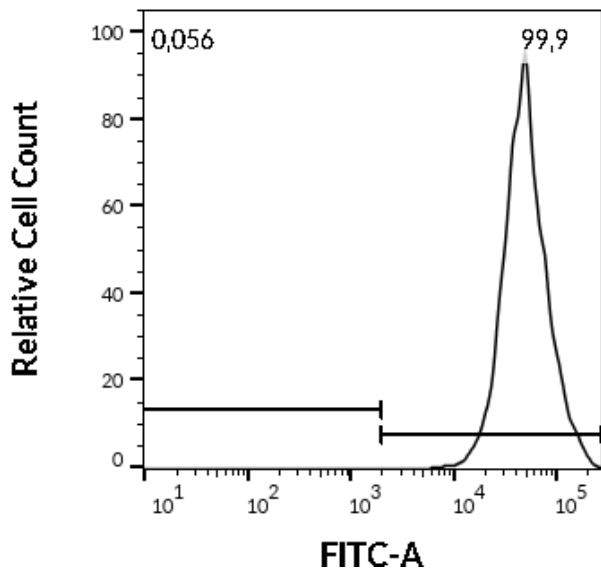
Zamejene granulocite prikažite v obliki histogramov, na katerih os X predstavlja intenzivnost fluorescence na kanalu FITC. Uporabite negativno kontrolno reakcijo, da nastavite ustrezno zamejitev za razločevanje pozitivnih (aktivnih fagocitoznih celic, ki tvorijo RKS) in negativnih (nefagocitoznih celic, ki ne tvorijo RKS) granulocitov. Zamejitev kopirajte v stimulacijsko reakcijo *E. coli* in pozitivno kontrolno reakcijo (slike 2a, 2b, 2c).

Granulociti, pri katerih pride do oksidativnega izbruha, imajo svetlo fluorescence rodamina 123. Izračunajte povprečno intenzivnost fluorescence pozitivnih in negativnih granulocitov. Intenzivnost fluorescence je neposredno sorazmerna z znotrajcelično aktivnostjo encimov, ki tvorijo RKS.

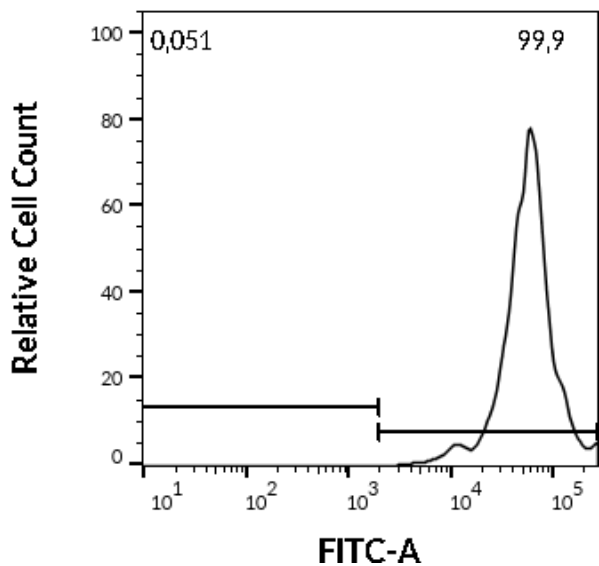
Slika 2a Histogram intenzivnosti fluorescence granulocitov pri negativni kontrolni reakciji



Slika 2b Histogram intenzivnosti fluorescence granulocitov pri stimulirani reakciji *E. coli*



Slika 2c Histogram intenzivnosti fluorescence granulocitov pri pozitivni kontrolni reakciji



Izračun in tolmačenje rezultatov analize

Kvantitativni parametri

Za indikacijo okvare fagocitne aktivnosti ali okvare tvorbe RKS se poročata in interpretirata dva kvantitativna parametra.

a) Relativno število pozitivnih granulocitov, pri katerih je prišlo do oskidativnega izbruha po stimulaciji z bakterijami *E. coli*.

b) Stimulacijski indeks (SI), izračunan kot razmerje povprečne intenzivnosti fluorescence (MFI) za pozitivne granulocite pri stimulirani reakciji *E. coli* in negativne granulocite pri negativni kontrolni reakciji.

Primer izračuna indeksa stimulacije

Preglednica 2 Negativna kontrolna reakcija: MFI negativnih in pozitivnih granulocitov

Populacija	Število (%)	Povprečni FITC-A
negativna	95,2	550
pozitivna	4,81	3995

Preglednica 3 Stimulirana reakcija *E. coli*: MFI negativnih in pozitivnih granulocitov

Populacija	Število (%)	Povprečni FITC-A
negativna	0,056	1224
pozitivna	99,9	53836

Razmerje vrednosti MFI za pozitivne granulocite pri stimulirani reakciji *E. coli* (v preglednici 3) se deli z vrednostjo MFI za negativne granulocite pri negativni kontrolni reakciji (v preglednici 2).

$$\frac{\text{Vrednost MFI pozitivnih granulocitov iz E.coli stimulirane reakcije}}{\text{Vrednost MFI negativnih granulocitov iz reakcije negativne kontrole}} =$$

$$\frac{53836}{550} = \text{SI (stimulacijski indeks)} = 98$$

Kvalitativni parametri

Interpretacija kvalitativnih podatkov vključuje prekrivne histograme, s katerimi se oceni porazdelitev signala in določijo posamezni vrhi, ki jih je treba pri več granulocitnih populacijah analizirati ločeno.

Pri **okvarah z oksidativnimi izbruhi** (odsotnost oksidacije DHR123) granulocitni histogrami prikažejo skladnost porazdelitve signala med stimulacijsko reakcijo *E. coli* in pozitivno kontrolno reakcijo (slike 4, 5, 6).

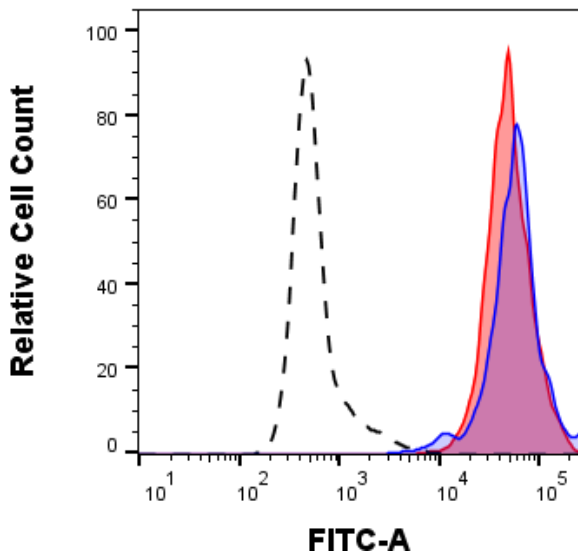
Pri **okvarah fagocitne aktivnosti** (zmanjšan zajem delcev) granulocitni histogrami prikažejo neskladnost porazdelitve signala med stimulacijsko reakcijo *E. coli* in pozitivno kontrolno reakcijo. Pri stimulirani reakciji *E. coli* je granulocitna populacija razdeljena na več vrhov različnih intenzivnosti fluorescence, medtem ko ima pozitivna kontrolna reakcija en vrh (slika 7).

OPOMBA: Zaznavanje nenavadnih rezultatov kaže samo sum na bolezen, ki jo je treba nato potrditi z drugimi testi.

Normalen rezultat zdravega darovalca

Po stimulaciji z **obema**, *E. coli* in pozitivno kontrolno reakcijo, granulociti izražajo velik oksidativni izbruh (slika 3).

Slika 3 Prekrivni histogram: Zdrav darovalec z okvaro oksidativnega izbruha (SI = 98, relativno število pozitivnih granulocitov 99,9 %). Porazdelitev signala za stimulirane granulocite *E. coli* (rdeča), granulocite negativne kontrolne reakcije (s črnimi črtami) in granulocite pozitivne kontrolne reakcije (modra) v detektorju FITC.



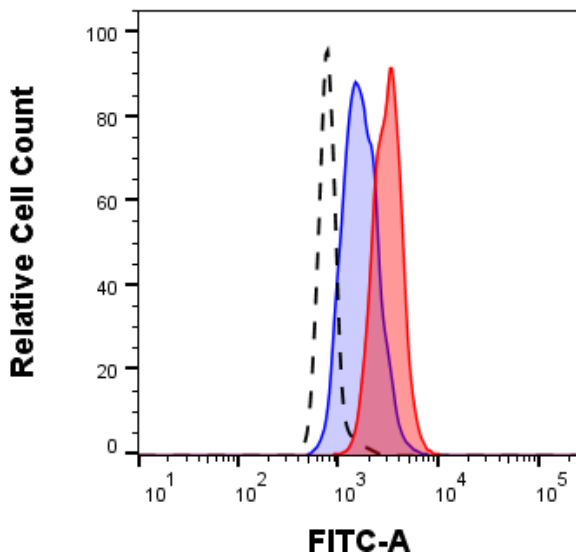
Rezultati, ki kažejo na okvaro oksidativnega izbruha

1) En vrh z majhno intenzivnostjo signala

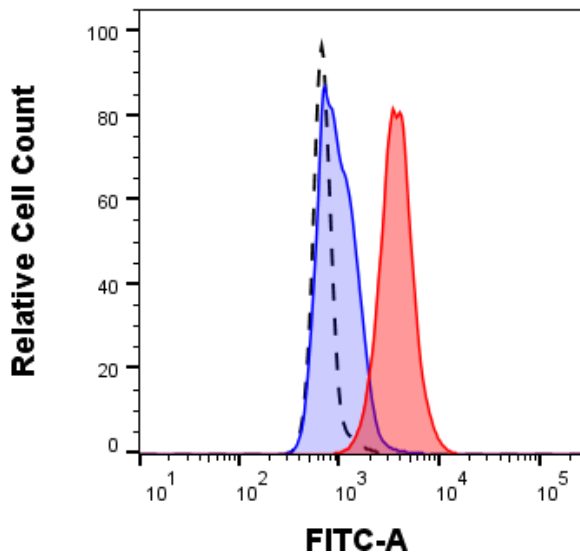
Če granulociti po stimulaciji z **obema**, *E. coli* in pozitivno kontrolno reakcijo, izražajo majhen oksidativni izbruh, to pomeni **pomanjkanje mieloperoksidaze (MPO)** (slika 4) ali manj pogosto **kronično granulomatozno bolezen (KGB)** (slika 5). Intenzivnost oksidativnega izbruha pri KGB je odvisna od mutacije encimskega kompleksa oksidaze NADPH. Tip te bolezni vključuje pet avtosomno recesivnih tipov (1–5) in en X-vezan recisivni tip.

SVARILO: Analiza ne omogoča razlikovanja med KGB in pomanjkanjem MPO.

Slika 4 Prekrivni histogram: Bolnik s pomanjkanjem MPO, (SI = 11, relativno število pozitivnih granulocitov 89,7 %). Razporeditev signala za stimulirane granulocite *E. coli* (rdeča), granulocite negativne kontrolne reakcije (s črnimi črtami) in granulocite pozitivne kontrolne reakcije (modra) v detektorju FITC.



Slika 5 Prekrivni histogram: Moški z X-vezano KGB, (SI = 16, relativno število pozitivnih granulocitov 99 %). Razporeditev signala za stimulirane granulocite *E. coli* (rdeča), granulocite negativne kontrolne reakcije (s črnimi črtami) in granulocite pozitivne kontrolne reakcije (modra) v detektorju FITC.

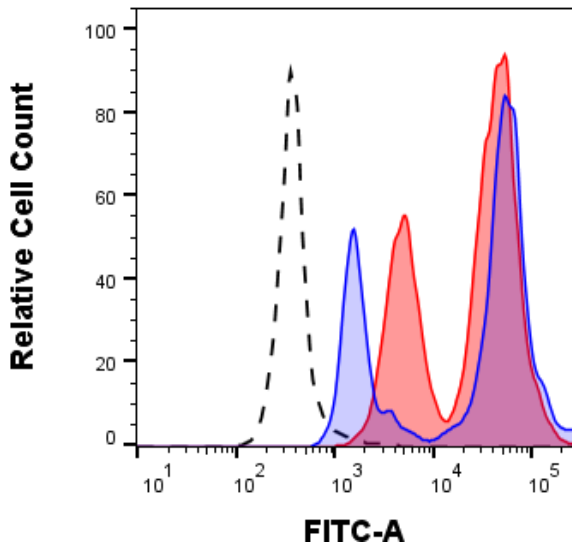


2) Dva vrha z različno intenzivnostjo signala

Če granulociti bolnice **izražajo dve podpopulaciji** z različno intenzivnostjo oksidativnega izbruha po stimulaciji z *E. coli* in pozitivno kontrolno reakcijo (slika 6), to pomeni, da je bolnica prenašalka X-vezane KGB.

SVARILO: Tri ali več vrhov na histogramu pomeni kontaminacijo zamejitve granulocitne populacije v SSC v primerjavi s točkovnim diagramom FSC (slika 1) z monociti ali mrtvimi nefagocitoznimi celicami.

Slika 6 Prekrivni histogram: Ženska, ki je prenašalka mutacije gena za NADPH oksidazo, povezano s kromosomom X. Dve granulocitni podpopulaciji z razliko v intenzivnosti oksidativnega izbruha (nizek vrh MFI SI = 14, relativno število granulocitov 35 %, visok vrh MFI SI = 125, relativno število granulocitov 65 %). Razporeditev signala za stimulirane granulocite *E. coli* (rdeča), granulocite negativne kontrolne reakcije (s črnimi črtami) in granulocite pozitivne kontrolne reakcije (modra) v detektorju FITC.

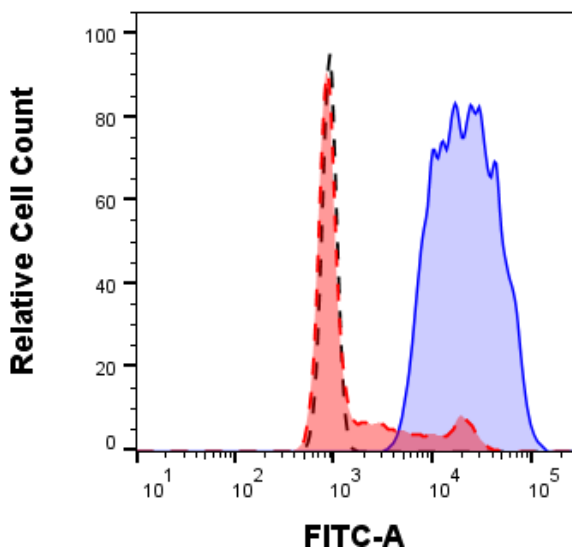


Rezultati, ki kažejo na okvaro fagocitne aktivnosti

Različen vrh pri pozitivni kontrolni reakciji in stimulirani reakciji *E. coli*

Če granulociti, stimulirani z *E. Coli* izražajo majhen oksidativni izbruh, granulociti, stimulirani s pozitivno kontrolno reakcijo, pa velik oksidativni izbruh (slika 7), to pomeni okvaro fagocitne aktivnosti, antikoagulant EDTA ali citrat v krvnem vzorcu ali star ali nepravilno shranjen vzorec.

Slika 7 Prekrivni histogram: Vzorec, antikoaguliran z EDTA (nizek vrh MFI SI = 1, relativno število granulocitov 73 %, visok vrh MFI SI = 25, relativno število 9 %). Razporeditev signala za stimulirane granulocite *E. coli* (rdeča), granulocite negativne kontrolne reakcije (s črnimi črtami) in granulocite pozitivne kontrolne reakcije (modra) v detektorju FITC.



11. Učinkovitost analize

Natančnost (ponovljivost in obnovljivost)

Obnovljivost analize so določili na osnovi podatkov petih operaterjev, ki so analizirali šest krvnih vzorcev zdravih krvodajalcev na isti dan in pri enakih eksperimentalnih pogojih.

Izračunali so naslednje parametre:

a) za relativno število pozitivnih granulocitov

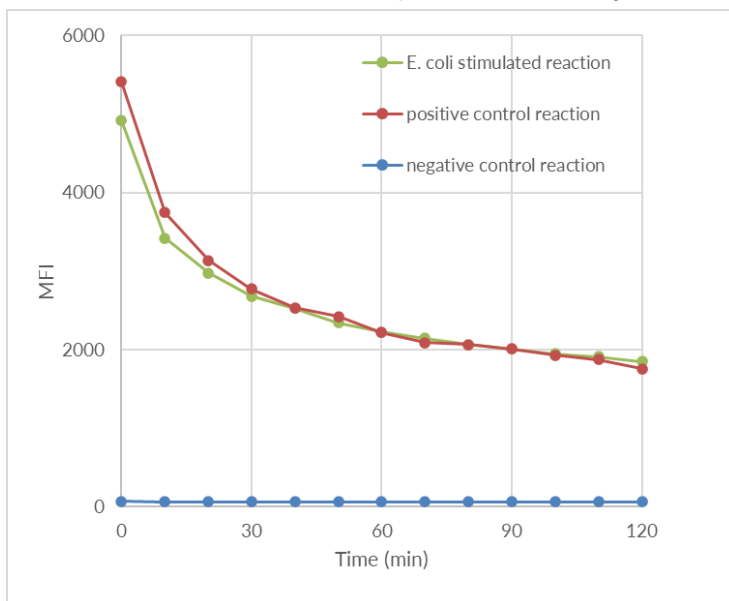
KV = 2 %

b) za določitev indeksa stimulacije

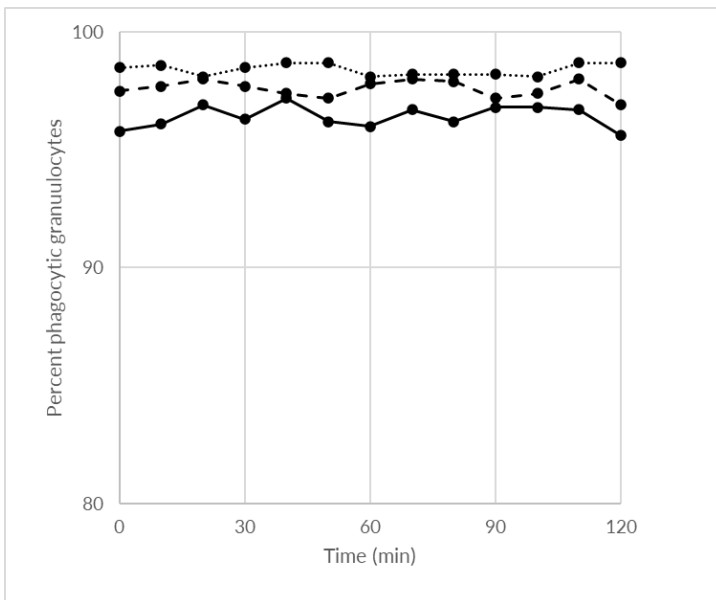
KV = 11 %

Ponovljivosti analize niso potrdili. Zaradi dinamike sprememb MFI, povezanih s sproščanjem R123 iz celic (slike 8, 9, 10), bodo vrednosti ponovljivosti odvisne od časa, pretekega med koncem obdelave vzorca (fiksacija/liza eritrocitov) in analizo FACS. Priporočljivo je opraviti analizo majhnega niza vzorcev in jih potem analizirati znotraj standardiziranega ozkega časovnega okna. Pozneje lahko analizirate tudi večje nize, npr. po večjem časovnem intervalu (40 minut), da zmanjšate variabilnost MFI.

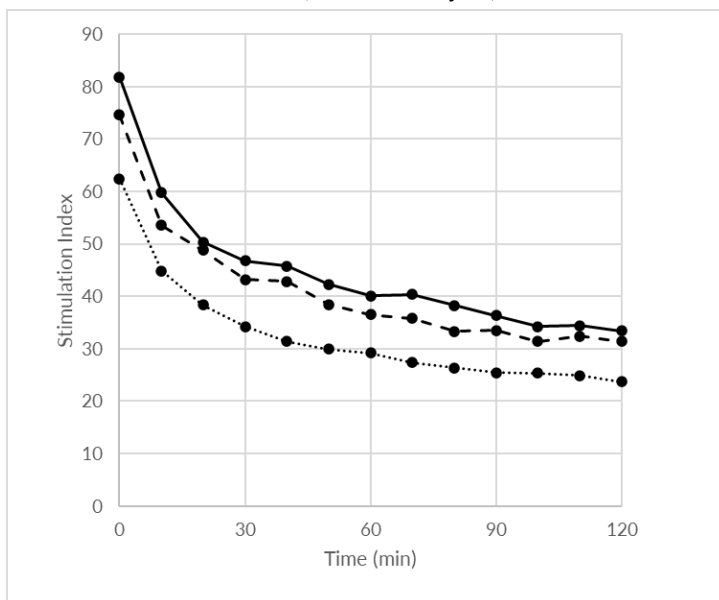
Slika 8 Razvoj povprečne inventivnosti fluorescence (MFI) granulocitov glede na čas po lizi eritrocitov; en krvni vzorec kot primer (zdrav krvodajalec).



Slika 9 Razvoj fagocitne aktivnosti granulocitov (%) glede na čas po lizi eritrocitov; 3 različni krvi vzorci (zdravi krvodajalci).



Slika 10 Razvoj stimulacijskega indeksa glede na čas po lizi eritrocitov; 3 različni krvi vzorci (zdravi krvodajalci).



12. Klinična učinkovitost

Analizo so ocenili s primerjalnimi meritvami z izdelkom PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH), pri čemer so uporabili vzorce skupno 47 bolnikov (preglednica 4). Oba kompleta sta zaznala: a) neuspešno zaužitje delcev (majhno fagocitno aktivnost) in b) motnje v oksidativnem izbruhu (pomanjkanje MPO, KGB) s 100-% občutljivostjo in 100-% specifičnostjo.

Preglednica 4 Značilnosti bolnikov v študiji ocenjevanja učinkovitosti

Značilnosti bolnikov	n
Zdrav krvodajalec (nepovezana imunološka bolezen)	40
KGB (2 z boleznijo in en prenašalec KGB)	3
Pomanjkanje MPO	2
Majhna fagocitna aktivnost (model boleznj - antikoagulant EDTA)	2
Stari vzorci (ponovljene meritve pri zdravih krvodajalcih v 48 urah)	4

13. Pričakovane vrednosti

Normalen razpon aktivnosti oksidativnega izbruha granulocitov je bil določen v 40 vzorcih periferne krvi zdravih odraslih ljudi.

- Granulociti z aktivnostjo oksidativnega izbruha
90–100 %
- Indeks stimulacije granulocitov > 30
3. percentil = 31
Mediana = 56
97. percentil = 97

Ker se indeks stimulacije lahko razlikuje v različnih laboratorijih in na različnih instrumentih, MORA vsak laboratorij določiti normalni razpon ob uporabi lastnih pogojev testiranja na vzorcih lokalne populacije normalnih krvodajalcev.

14. Moteče snovi in omejitve

Antikoagulant EDTA in citrat imata negativen vpliv na rezultate analize.

15. Reference

- 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. Blagovne znamke

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ in FlowJo™ so registrirane blagovne znamke družbe Becton, Dickinson and Company. Sysmex™ je registrirana blagovna znamka družbe Sysmex Corporation. VenturiOne® je registrirana blagovna znamka družbe Applied Cytometry. Infinicyt™ je registrirana blagovna znamka družbe Cytognos S.L..

17. Zgodovina sprememb

Različica 8, ED7042_IFU_v8

Spremenjena postavitev navodila za uporabo.

18. Proizvajalec

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Češka republika

Podatki za stik

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

19. Pooblaščenji zastopniki

N/A

OPOMBA: O vseh resnih incidentih, ki se zgodijo v povezavi s pripomočkom, je treba poročati proizvajalcu in lokalnemu pristojnemu organu.