

exbio

Kit FagoFlowEx

100 test | N. Cat. ED7042



Istruzioni per l'uso (IT)

Versione: ED7042_IFU_v8_IT

Data di pubblicazione: 14-04-2023

Simboli utilizzati nell'etichettatura del dispositivo

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Limite di temperatura
	Marcatura CE di dichiarazione di conformità		Tenere lontano dalla luce del sole
	Produttore		Tenere all'asciutto Conservare al riparo dall'umidità
	Codice Unico di Identificazione		Contenuti
	Consultare le istruzioni per l'uso		Marchio UKCA
	Contenuto sufficiente per <n> test		
	Numero di catalogo		
	Codice di lotto		
	Data di scadenza		

1. Uso Previsto

Il Kit FagoFlowEx è destinato alla determinazione dell'attività fagocitaria dei granulociti neutrofili mediante la misurazione del burst respiratorio (ossidativo) nel sangue intero tramite citometria a flusso.

Cosa viene rilevato e/o misurato

Il dispositivo rileva e misura due parametri, utilizzando il substrato fluorogenico diidrorodamina 123:

- percentuale di granulociti neutrofili che producono specie reattive dell'ossigeno (ROS) in risposta all'ingestione di batteri *E. coli*
- attività intracellulare degli enzimi produttori di ROS.

Funzione del dispositivo

Il dispositivo è destinato allo screening/all'uso come ausilio nella diagnosi di immunodeficienza congenita o acquisita.

Contesto di stato fisiologico o patologico

L'incapacità dei granulociti neutrofili di catalizzare la produzione di specie reattive dell'ossigeno causa la malattia granulomatosa cronica (CGD) che rappresenta un gruppo di malattie ereditarie con un fenotipo comune caratterizzato da infezioni batteriche e fungine gravi ricorrenti e formazione di granulomi tissutali ^(1, 2, 3, 4). Risultati compatibili con la CGD possono altresì ottenersi in presenza di deficit di MPO che è il difetto fagocitario più comune il quale si presenta solitamente come fenotipo normale senza un'aumentata incidenza di infezioni ⁽⁵⁾.

Una diminuzione dell'attività fagocitaria, in assenza di difetto degli enzimi produttori di ROS, si verifica in varie altre condizioni cliniche associate alla soppressione immunitaria, sia immunodeficienze primarie variabili e carenze di opsonina plasmatica, sia immunodeficienze secondarie ^(6, 7).

Tipo di test

Non automatizzato

Quantitativo

Tipo di campione richiesto

Sangue umano intero anticoagulato con eparina

Popolazione da sottoporre al test

Pazienti con sospetto difetto della funzione dei granulociti.

2. Utilizzatore previsto

Il dispositivo è destinato esclusivamente all'uso professionale in laboratorio. Non destinato ad analisi decentrate (near-patient testing) o a test autodiagnostico.

Requisiti di qualificazione

L'utilizzatore previsto deve disporre di competenze all'avanguardia nelle analisi di citometria a flusso di cellule umane, nelle tecniche di laboratorio standard, comprese abilità di pipettaggio, manipolazione sicura e corretta di campioni biologici umani.

L'utilizzatore previsto deve operare in conformità alla norma EN ISO 15189 o ad altre disposizioni nazionali, ove applicabile.

3. Principio del test

Il test si basa sulla misurazione della produzione di ROS nei granulociti neutrofili tramite utilizzo del substrato fluorogenico diidrorodamina 123 (DHR123).

Durante il test un campione di sangue umano viene incubato con batteri *E. coli* inattivati tramite calore e con DHR123. La miscela di reazione viene portata a 37 °C per promuovere la fagocitosi di *E. coli* da parte dei granulociti neutrofili. Durante il periodo di incubazione i batteri vengono attivamente fagocitati dalle cellule mentre la DHR123 non fluorescente entra passivamente nell'ambiente intracellulare secondo il suo gradiente di concentrazione. I batteri rimangono intrappolati all'interno dei fagosomi cellulari e innescano reazioni enzimatiche che portano alla produzione di ROS. Gli ioni ROS ossidano la DHR123 che viene convertita in rodamina 123 (R123) fluorescente e viene eccitata dal raggio laser di un citofluorimetro durante l'acquisizione del campione ematico. La successiva emissione di luce della R123, corrispondente all'attività intracellulare degli enzimi produttori di ROS, viene catturata e analizzata mediante citofluorimetro.

Parallelamente alla stimolazione con *E. coli*, vengono eseguite altre due reazioni: una reazione di controllo negativo, che è una reazione in assenza di *E. coli*, e una reazione di controllo positivo, che è una reazione che utilizza forbolo 12-miristato 13-acetato in grado di attivare gli enzimi produttori di ROS in assenza di fagocitosi.

Le cellule vengono considerate attivamente fagocitanti se la loro fluorescenza supera quella delle cellule della reazione di controllo negativo. Il risultato è riportato come percentuale di cellule fagocitanti. L'intensità della fluorescenza delle cellule fagocitanti è direttamente proporzionale all'attività intracellulare degli enzimi produttori di ROS.

4. Reagenti forniti

Contenuti

Il dispositivo Kit FagoFlowEx, sufficiente per 100 test, viene fornito con i seguenti reagenti:

E. coli (5 fiale) contenenti batteri *E. coli* liofilizzati, 1 fiala è sufficiente per la stimolazione di 20 campioni ematici (ED7042-1).

DHR123 (5 fiale) contenenti diidrorodamina 123 liofilizzata, 1 fiala è sufficiente

per la colorazione di 60 campioni ematici (ED7042-2).

Controllo di stimolazione (5 fiale) contenenti PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) liofilizzato, 1 fiala da impiegare per 20 test di controllo positivo (ED7042-3).

Soluzione di lisi (1 flacone) contenente 15 ml di soluzione pronta all'uso (ED7042-4).

5. Materiali necessari ma non forniti

Provette a fondo tondo da 12 x 75 mm

Acqua deionizzata (grado reagente)

6. Attrezzatura necessaria

Pipetta automatica con puntali monouso (10 – 1000 µl) per pipettare campioni e reagenti

Agitatore vortex

Termostato (incubatore ad aria) o bagnomaria in grado di incubare provette a 37 °C

Citometro a flusso dotato di sorgente di eccitazione laser (488 nm), rilevatori di dispersione, filtri ottici e rilevatore di emissione idonei alla cattura del segnale emesso dal fluorocromo indicato nella Tabella 1.

Tabella 1 Caratteristiche spettrali del fluorocromo utilizzato dal dispositivo

Fluorocromo	Eccitazione [nm]	Emissione [nm]
Rodamina 123	488	525

NOTA: Il dispositivo è stato testato con citofluorimetri BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) e Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Conservazione e manipolazione

Conservare a 2-8 °C.

Evitare l'esposizione prolungata alla luce.



Non congelare.

Vedere la Sezione 10 "Procedura (Preparazione dei reagenti)" per informazioni sulla stabilità durante l'uso e sul periodo di validità dopo la prima apertura, unitamente alle condizioni di conservazione e alla stabilità delle soluzioni di lavoro (ove pertinente).

8. Avvertenze, precauzioni e limitazioni d'impiego

Classificazione dei pericoli GHS

AVVERTENZA: la soluzione di lisi (ED7042-4) contiene formaldeide (Numero CAS 50-00-0) e metanolo (Numero CAS 67-56-1) in concentrazioni classificate come pericolose.

Elementi nell'etichetta	Avvertenze
	Pericolo
	
Frase H	H302 Nocivo se ingerito. H315 Provoca irritazione cutanea. H317 Può provocare una reazione allergica cutanea. H319 Provoca grave irritazione oculare. H335 Può irritare le vie respiratorie. H341 Sospettato di provocare alterazioni genetiche. H350 Può provocare il cancro.
Frase P	P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. P264 Dopo l'uso, lavare accuratamente le mani e le parti del corpo esposte. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P301+P312 IN CASO DI INGESTIONE: in caso di malessere, contattare un medico. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P308+P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. P333+P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli

	prima di indossarli nuovamente.
--	---------------------------------

Consultare la scheda di dati di sicurezza (SDS) disponibile sulla pagina del prodotto sul sito www.exbio.cz per informazioni complete sui rischi associati alle sostanze chimiche e alle miscele contenute nel prodotto, e su come devono essere manipolate e smaltite.

Rischio biologico

I campioni biologici umani, i campioni ematici ed eventuali materiali che vengono a contatto con essi sono sempre considerati materiali infetti.

Utilizzare dispositivi di protezione e sicurezza individuale per evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose.

Seguire tutte le norme, i regolamenti e le procedure applicabili per la manipolazione e lo smaltimento di materiali infetti.

Segni di deterioramento

Il normale aspetto dei reagenti liofilizzati forniti è quello di una polvere bianca (E. coli e controllo di stimolazione) o di una sostanza liofilizzata solida (cake) (DHR123). Non utilizzare il reagente se si osservano cambiamenti nell'aspetto, ad esempio cambiamento di colore o liquefazione.

Il normale aspetto della soluzione di lisi è quello di un liquido limpido. Non utilizzare il reagente se si osservano cambiamenti nell'aspetto, ad esempio torbidità o segni di precipitazione.

Limiti di utilizzo

Non utilizzare dopo la data di scadenza riportata sulle etichette del prodotto.

9. Campione

Utilizzare sangue venoso periferico raccolto in recipiente per campioni, classificato come dispositivo medico, in presenza di anticoagulante eparina.

ATTENZIONE: Anticoagulanti EDTA e citrato influiscono negativamente sugli esiti dell'analisi.

Il campione ematico nella provetta di raccolta va conservato a temperatura ambiente. Non refrigerare.

Analizzare il campione ematico entro e non oltre le 24 ore successive alla raccolta.

10. Procedura

Preparazione dei reagenti forniti

E. coli

Ricostituire il contenuto della fiala di *E. coli* con 250 µl di acqua deionizzata. Preparare una soluzione fresca ogni giorno in cui viene effettuata la misurazione, conservarla a 2-8 °C e utilizzarla entro le 8 ore successive. In alternativa, il reagente può essere congelato a una temperatura compresa tra -20 °C e -80 °C e utilizzato entro 7 giorni.

ATTENZIONE: Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.

DHR123

Ricostituire il contenuto della fiala di DHR123 con 650 µl di acqua deionizzata. Preparare una soluzione fresca ogni giorno in cui viene effettuata la misurazione, conservarla a 2-8 °C e utilizzarla entro le 8 ore successive. In alternativa, il reagente può essere congelato a una temperatura compresa tra -20 °C e -80 °C e utilizzato entro 7 giorni.

NOTA: La soluzione suddivisa in aliquote può sopportare fino a 5 cicli di congelamento/scongelo.

Controllo di stimolazione

Ricostituire il contenuto del controllo di stimolazione con 250 µl di acqua deionizzata. Preparare una soluzione fresca ogni giorno in cui viene effettuata la misurazione, conservarla a 2-8 °C e utilizzarla entro le 8 ore successive. In alternativa, il reagente può essere congelato a una temperatura compresa tra -20 °C e -80 °C e utilizzato entro 7 giorni.

NOTA: La soluzione in aliquote può sopportare fino a 5 cicli di congelamento/scongelo.

Soluzione di lisi

Il reagente è pronto all'uso.

NOTA: Portare il reagente a temperatura ambiente prima dell'uso.

Marcatura del campione

1. Per ogni paziente in esame, etichettare tre provette a fondo tondo da 12 x 75 mm con l'opportuna identificazione e marcatura del campione come segue:

reazione stimolata con E. coli

reazione di controllo positivo (stimolazione PMA)

e reazione di controllo negativo.

Pipettare sul fondo delle provette

- 10 μ l di *E. coli* nella provetta contrassegnata come “reazione stimolata con *E. coli*”.
 - 10 μ l di controllo di stimolazione nella provetta contrassegnata come “reazione di controllo positivo”.
 - Non pipettare nulla nella provetta contrassegnata come “reazione di controllo negativo”.
2. Pipettare 50 μ l di campione ematico ben miscelato sul fondo di ciascuna provetta e agitare delicatamente su vortex.
ATTENZIONE: Evitare di pipettare il sangue sulla parete della provetta. Se una traccia o una gocciolina di sangue rimangono sulla parete della provetta, potrebbero non venire marcati dal reagente, o gli eritrociti potrebbero non venire lisati e il risultato del test potrebbe non essere valido.
 3. Pipettare 10 μ l di DHR123 sul fondo di ciascuna provetta e agitare delicatamente su vortex.
 4. Porre le provette a 37 °C per 20 minuti in un bagnomaria o per 30 minuti in un incubatore ad aria.
 5. Aggiungere 50 μ l di soluzione di lisi a ciascuna delle provette. Agitare delicatamente su vortex e incubare le provette per 5 minuti al buio a temperatura ambiente.
 6. Aggiungere 1 ml di acqua deionizzata in ciascuna provetta, agitare delicatamente su vortex e incubare per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.
 7. Acquisire immediatamente il campione marcato sul citofluorimetro. Qualora il campione marcato non venga acquisito immediatamente, tappare la provetta, conservarla a 2-8 °C al buio ed analizzarla entro 2 ore.

ATTENZIONE: La fluorescenza della rodamina 123, prodotta dall'ossidazione della DHR123, è rilevata nel canale FITC (525 nm). Poiché la rodamina 123 è rilasciata rapidamente dai granulociti, come mostrato in Figura 8, i campioni devono essere **misurati il prima possibile** (non oltre 2 ore dopo la lisi), preferibilmente **all'interno di una finestra temporale ristretta standardizzata** (vedere pagina 18).

ATTENZIONE: Per evitare aggregati, agitare su vortex il campione marcato immediatamente prima dell'acquisizione sul citofluorimetro.

Analisi citofluorimetrica

Il citofluorimetro selezionato per l'uso con il dispositivo Kit FagoFlowEx deve essere regolarmente calibrato utilizzando microsfere fluorescenti per garantire una stabile sensibilità dei rilevatori, secondo le indicazioni del produttore del citometro.

Se non mantenuto correttamente, il citofluorimetro può produrre risultati errati.

Per i laser e i rilevatori di fluorescenza fare riferimento alle specifiche tecniche del citometro fornite dal produttore, in base alle caratteristiche di eccitazione ed emissione dei fluorocromi indicate nella Sezione 6 Attrezzatura necessaria.

Prima di procedere con l'analisi del campione marcato, impostare le tensioni al valore desiderato sui rilevatori di fluorescenza. La tensione sul fotomoltiplicatore deve essere impostata su un livello sufficientemente alto, in modo che il minimo di eventi marcati come negativi interferisca con il canale 0 sull'asse della fluorescenza. Inoltre la tensione del fotomoltiplicatore non deve superare valori ai quali gli eventi positivi vengano spinti verso l'asse destro.

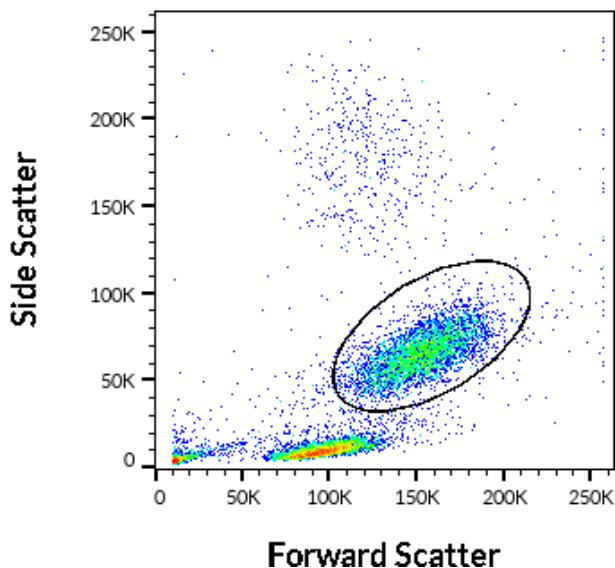
Per l'analisi dei dati misurati, è possibile utilizzare il software del citometro sviluppato dal produttore, o un software specifico progettato per l'analisi dei dati citometrici offline (ad esempio FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analisi del campione di un paziente

Acquisire almeno 5.000 - 10.000 eventi leucocitari. Visualizzare gli eventi acquisiti nel dot-plot scatter laterale (side-scatter, SSC) vs scatter frontale (forward-scatter, FSC). Impostare il gate sui granulociti come illustrato nella Figura 1.

ATTENZIONE: L'ingestione dei batteri influenza la posizione dei granulociti nel dot-plot SSC-FSC. Per questo motivo, regolare il gate singolarmente per ciascuna reazione.

Figura 1 Determinazione della popolazione granulocitaria



Visualizzare i granulociti selezionati (gated) come istogrammi in cui l'asse X rappresenta l'intensità di fluorescenza nel canale FITC. Utilizzare la reazione di controllo negativo per impostare un gate appropriato al fine di differenziare i granulociti positivi (cellule attivamente fagocitanti produttrici di ROS) e negativi (cellule non fagocitanti non produttrici di ROS). Copiare il gate sulla reazione di stimolazione con *E. coli* e sulla reazione di controllo positivo (Figura 2a, 2b, 2c).

I granulociti che subiscono il burst ossidativo presentano una fluorescenza brillante della rodamina 123. Calcolare l'intensità di fluorescenza media dei granulociti positivi e negativi. L'intensità della fluorescenza è direttamente proporzionale all'attività intracellulare degli enzimi produttori di ROS.

Figura 2a Istogramma dell'intensità di fluorescenza dei granulociti della reazione di controllo negativo

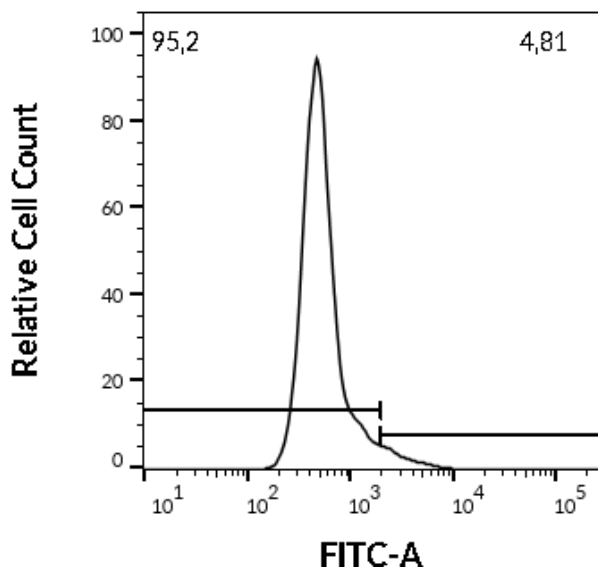


Figura 2b Istogramma dell'intensità di fluorescenza dei granulociti della reazione stimolata con E. coli

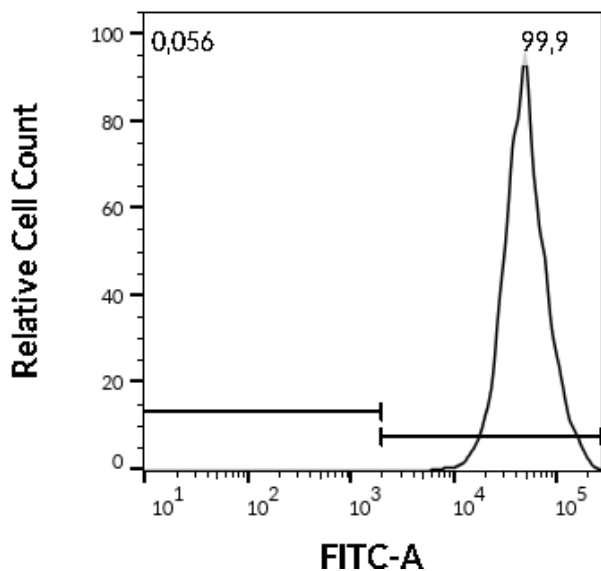
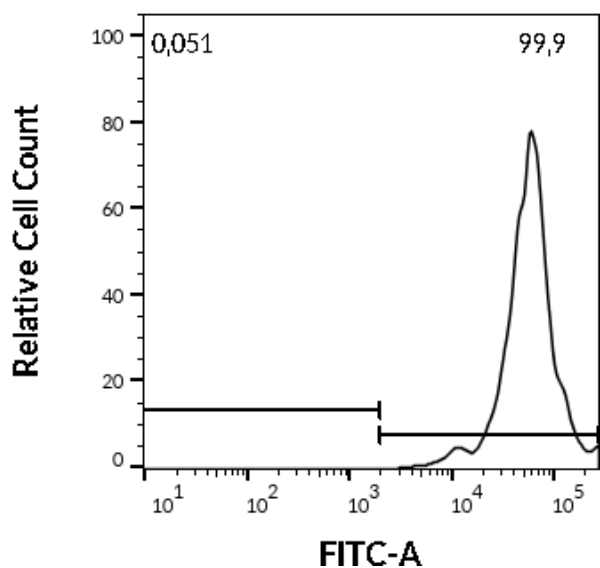


Figura 2c Istogramma dell'intensità di fluorescenza dei granulociti della reazione di controllo positivo



Calcolo e interpretazione dei risultati analitici

Parametri quantitativi

Due parametri quantitativi vengono riportati e interpretati per verificare che non vi sia alcuna indicazione di un difetto dell'attività fagocitaria, o di un difetto nella produzione di ROS:

a) Numero relativo di granulociti positivi che hanno presentato burst respiratorio dopo la stimolazione con *E. coli*.

b) Indice di stimolazione (SI) calcolato come rapporto tra l'intensità media di fluorescenza (MFI) dei granulociti positivi della reazione stimolata con *E. coli* e quella dei granulociti negativi della reazione di controllo negativo.

Esempio del calcolo dell'indice di stimolazione

Tabella 2 Reazione di controllo negativo MFI dei granulociti negativi e positivi

Popolazione	Numero (%)	FITC-A media
negativa	95,2	550
positiva	4,81	3995

Tabella 3 Reazione stimolata con *E. coli*: MFI dei granulociti negativi e positivi

Popolazione	Numero (%)	FITC-A media
negativa	0,056	1224
positiva	99,9	53836

Viene calcolato il rapporto tra il valore di MFI dei granulociti positivi della reazione stimolata con *E. coli* (in Tabella 3) e il valore di MFI dei granulociti negativi della reazione di controllo negativo (in Tabella 2).

$$\frac{\text{Valore di MFI dei granulociti positivi della reazione stimolata con E.coli}}{\text{Valore di MFI dei granulociti negativi della reazione di controllo negativo}} =$$

$$\frac{53836}{550} = \text{SI (Indice di Stimolazione)} = 98$$

Parametri qualitativi

L'interpretazione qualitativa dei dati comporta la sovrapposizione (overlay) di istogrammi per valutare la distribuzione del segnale e per identificare singoli picchi che, in presenza di più popolazioni di granulociti, dovranno essere analizzati separatamente.

In caso di **difetti di burst respiratorio** (mancanza di ossidazione della DHR123), gli istogrammi risultanti dei granulociti mostreranno una convergenza di distribuzione del segnale tra la reazione di stimolazione con *E. coli* e la reazione di controllo positivo (Figura 4, 5, 6).

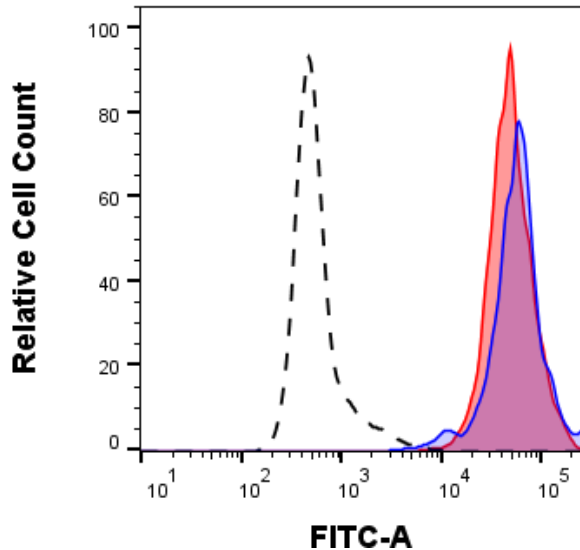
In caso di **difetti dell'attività fagocitaria** (ridotta fagocitosi di particelle), gli istogrammi risultanti dei granulociti mostreranno una discrepanza nella distribuzione del segnale tra la reazione di stimolazione con *E. coli* e la reazione di controllo positivo. Nella reazione stimolata con *E. coli* la popolazione di granulociti apparirà suddivisa in più picchi di diverse intensità di fluorescenza, mentre per la reazione di controllo positivo si avrà un singolo picco (Figura 7).

NOTA: Il rilevamento di risultati anomali indica solo un sospetto di malattia che deve essere confermata da altri test.

Risultati normali ottenuti da donatori sani

I granulociti mostrano un alto burst respiratorio **sia** dopo la stimolazione con *E. coli* **sia** nella reazione di controllo positivo (Figura 3).

Figura 3 Overlay dell'istogramma: donatore sano senza difetto di burst respiratorio, (SI = 98, numero relativo di granulociti positivi 99,9%). Distribuzione del segnale per i granulociti stimolati con *E. coli* (area in rosso), per i granulociti della reazione di controllo negativo (picco tratteggiato in nero) e per i granulociti della reazione di controllo positivo (area in blu) nel rivelatore FITC.



Risultati che indicano un difetto di burst respiratorio

1) Un picco singolo con bassa intensità di segnale

Un burst respiratorio basso dei granulociti sia dopo stimolazione con *E. coli* sia dopo la reazione di controllo positivo, è indicativo di **deficit di mieloperossidasi (MPO)** (Figura 4) oppure, meno comunemente, di **malattia granulomatosa cronica (CGD)** (Figura 5). L'intensità del burst respiratorio nella CGD dipende dalla mutazione del complesso enzimatico NADPH ossidasi. Della malattia esistono cinque fenotipi autosomici recessivi (1-5) e un fenotipo recessivo legato all'X.

ATTENZIONE: Il test non è in grado di distinguere tra deficit di CGD e di MPO.

Figura 4 Overlay dell'istogramma: Paziente con deficit di MPO, (SI = 11, numero relativo di granulociti positivi 89,7%). Distribuzione del segnale per i granulociti stimolati con *E. coli* (area in rosso), per i granulociti della reazione di controllo negativo (picco tratteggiato in nero) e per i granulociti della reazione di controllo positivo (area in blu) nel rilevatore FITC.

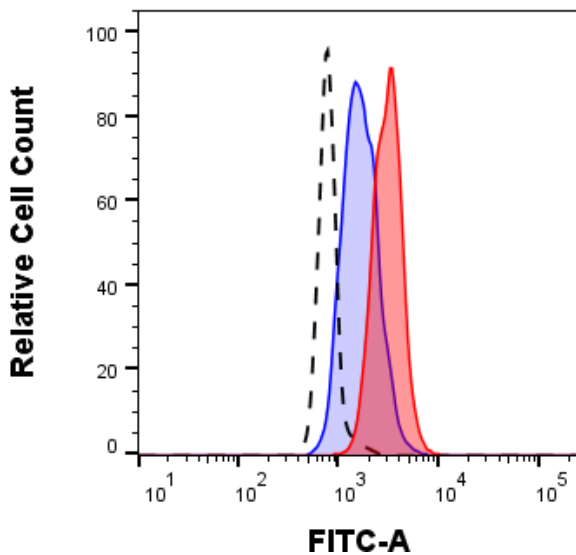
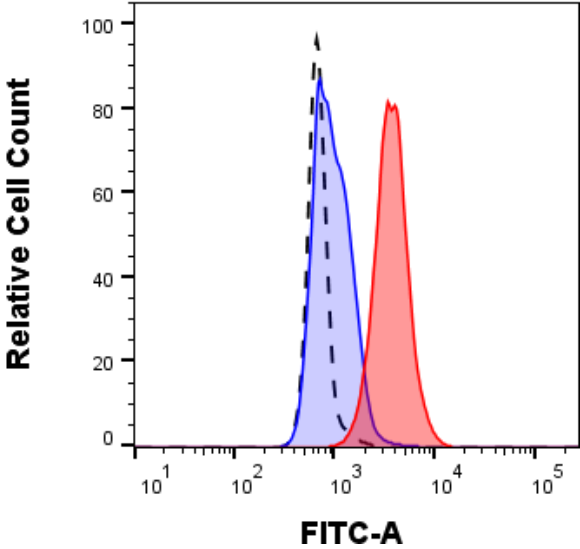


Figura 5 Overlay dell'istogramma: Paziente di sesso maschile con CGD legata all'X, (SI = 16, numero relativo di granulociti positivi 99%). Distribuzione del segnale per i granulociti stimolati con *E. coli* (area in rosso), per i granulociti della reazione di controllo negativo (picco tratteggiato in nero) e per i granulociti della reazione di controllo positivo (area in blu) nel rilevatore FITC.

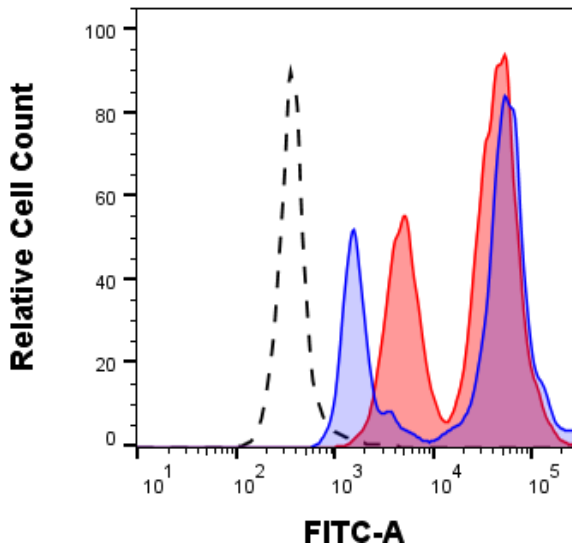


2) Due picchi con diversa intensità di segnale

La **presenza** in una paziente di sesso femminile di **due sottopopolazioni** di granulociti che differiscono per intensità del burst respiratorio sia dopo la stimolazione con *E. coli* sia dopo la reazione di controllo positivo (Figura 6), indica che la paziente è portatrice di CGD legata all'X.

ATTENZIONE: Tre o più picchi nell'istogramma indicano una contaminazione del gate della popolazione granulocitaria nel dot-plot SSC- FSC (Figura 1) con monociti o con cellule non fagocitanti morte.

Figura 6 Overlay dell'istogramma: Femmina portatrice di mutazione legata al cromosoma X nel gene NADPH ossidasi. Le due sottopopolazioni di granulociti differiscono per intensità del burst respiratorio (picco MFI basso SI = 14, numero relativo di granulociti 35%, picco MFI alto SI = 125, numero relativo di granulociti 65%). Distribuzione del segnale per i granulociti stimolati con *E. coli* (area in rosso), per i granulociti della reazione di controllo negativo (picco tratteggiato in nero) e per i granulociti della reazione di controllo positivo (area in blu) nel rilevatore FITC.

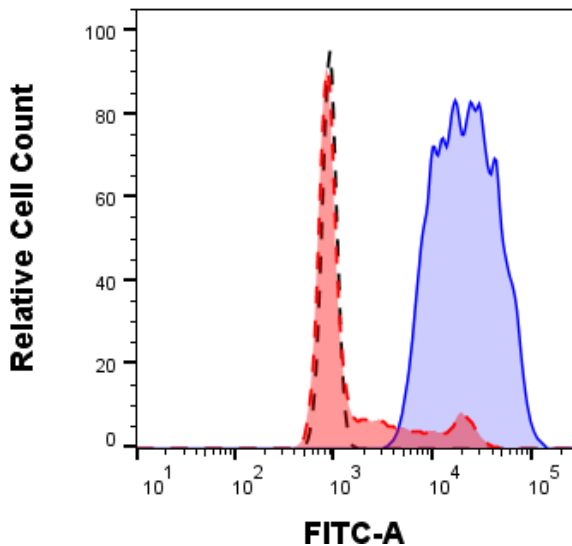


Risultati che indicano un difetto dell'attività fagocitaria

Pattern di picchi diverso tra la reazione di controllo positivo e la reazione stimolata con *E. coli*

La presenza di granulociti che, stimolati con *E. coli*, mostrano un basso burst respiratorio e di granulociti che, stimolati con una reazione di controllo positivo, mostrano un alto burst respiratorio (Figura 7), è indicativa di un difetto dell'attività fagocitaria dei granulociti, o in alternativa indica che il campione di sangue contiene EDTA anticoagulante, oppure citrato, oppure che il campione era vecchio o conservato in modo improprio.

Figura 7 Overlay dell'istogramma: Campione anticoagulato con EDTA (picco MFI basso SI = 1, numero relativo di granulociti 73%, picco MFI alto SI = 25, numero relativo di granulociti 9%). Distribuzione del segnale per i granulociti stimolati con *E. coli* (area in rosso), per i granulociti della reazione di controllo negativo (picco tratteggiato in nero) e per i granulociti della reazione di controllo positivo (area in blu) nel rivelatore FITC.



11. Prestazione analitiche

Precisione (ripetibilità e riproducibilità)

La **ripetibilità** del test è stata determinata basandosi su dati ottenuti da cinque operatori che hanno analizzato sei campioni ematici prelevati da donatori sani, nello stesso giorno, nelle stesse condizioni sperimentali.

Sono stati calcolati i seguenti parametri:

a) per determinare il numero relativo di granulociti positivi

CV = 2%

b) per determinare l'indice di stimolazione

CV = 11 %

La **ripetibilità** del test non è stata determinata. Data la dinamica delle variazioni di MFI associate al rilascio di R123 dalle cellule (Figura 8, 9, 10), i valori di ripetibilità potrebbero dipendere dal tempo trascorso tra la fine dell'elaborazione del campione (fissazione/lisi RBC) e l'analisi FACS. Si consiglia di eseguire l'analisi di piccole serie di campioni e di analizzarle all'interno di una finestra temporale ristretta standardizzata. In alternativa, serie più grandi possono essere analizzate successivamente, ad es. dopo un intervallo di tempo più ampio (40 minuti) per ridurre al minimo la variabilità della MFI.

Figura 8 Andamento dell'intensità media di fluorescenza (MFI) dei granulociti nel tempo, dopo lisi dei globuli rossi, un campione ematico mostrato come esempio (donatore sano).

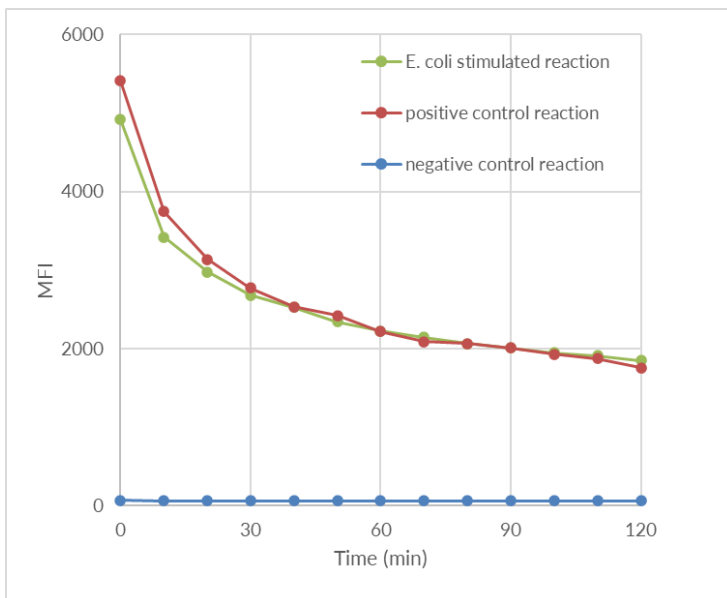


Figura 9 Andamento dell'attività fagocitaria dei granulociti (%) nel tempo, dopo lisi dei globuli rossi, 3 diversi campioni ematici (donatori sani).

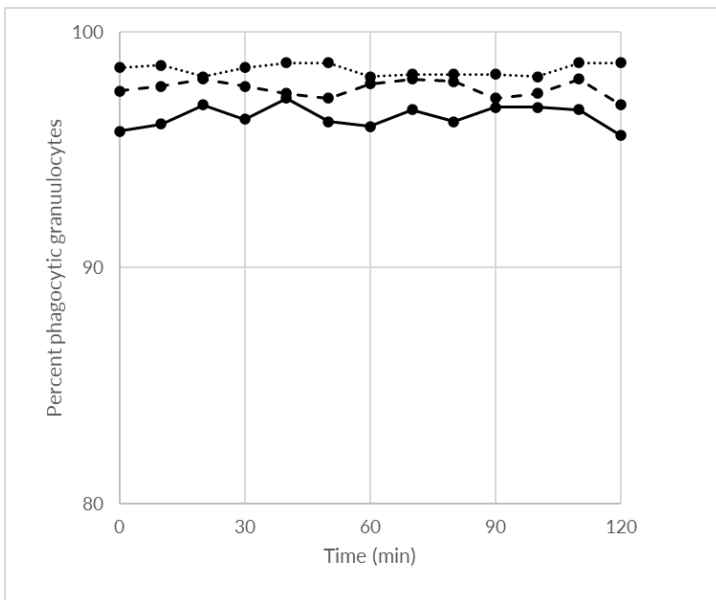
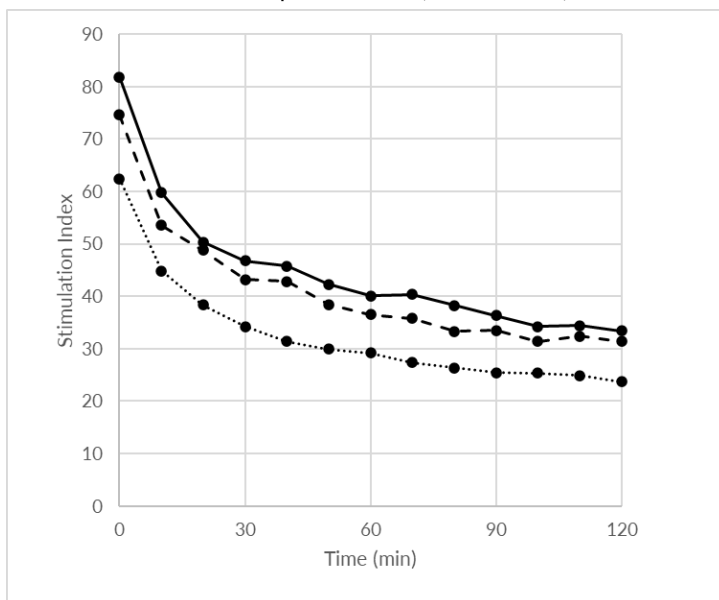


Figura 10 Andamento dell'indice di stimolazione nel tempo, dopo lisi dei globuli rossi, 3 diversi campioni ematici (donatori sani).



12. Prestazione cliniche

Il test è stato valutato tramite misurazioni comparative con il test PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) utilizzando campioni prelevati da un totale di 47 pazienti (Tabella 4). Entrambi i kit sono stati in grado di rilevare: a) mancata fagocitosi di particelle (bassa attività fagocitaria) e b) disturbi del burst ossidativo (deficit di MPO, CGD) con una sensibilità del 100% e una specificità del 100%.

Tabella 4 Caratteristiche del gruppo di pazienti nello studio di valutazione delle prestazioni

Caratteristica del paziente	n
Donatore sano (disturbo immunologico non correlato)	40
CGD (2 malati e un portatore di CGD)	3
Deficit di MPO	2
Bassa attività fagocitaria (modello di malattia - anticoagulante EDTA)	2
Vecchi campioni (misurazioni ripetute su donatori sani per 48 ore)	4

13. Valori previsti

L'intervallo di normalità dell'attività di burst respiratorio dei granulociti è stato stabilito nei 40 campioni di sangue periferico di adulti sani.

- Granulociti con attività di burst respiratorio
90-100%
- Indice di stimolazione di granulociti >30
3° percentile= 31
Mediana = 56
97° percentile = 97

Poiché l'indice di stimolazione potrebbe variare in laboratori diversi e con strumentazione diversa, ciascun laboratorio DEVE stabilire l'intervallo di normalità utilizzando le proprie condizioni analitiche su campioni prelevati dalla popolazione locale di donatori sani.

14. Sostanze che interferiscono e limitazioni

Anticoagulanti EDTA e citrato influiscono negativamente sugli esiti dell'analisi.

15. Riferimenti bibliografici

- 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., Styrt, 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. Marchi commerciali

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ e FlowJo™ sono marchi registrati di Becton, Dickinson e Company, Sysmex™ è un marchio registrato di Sysmex Corporation, VenturiOne® è un marchio registrato di Applied Cytometry, Infinicyt™ è un marchio registrato di Cytognos S.L..

17. Cronologia delle revisioni

Versione 8, ED7042_IFU_v8

Il layout delle istruzioni per l'uso è stato modificato.

18. Produttore

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Repubblica Ceca

Contatti

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

19. Rappresentanti autorizzati

N/A

NOTA: Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al produttore e all'autorità locale competente.