

exbio

FagoFlowEx Kit

100 test | Kat. No. ED7042



Kullanım Kılavuzu (TR)

Versiyon: ED7042_IFU_v8_TR

Yayın Tarihi: 14/04/2023

Cihaz etiketlemede kullanılan semboller

	İn Vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz		Sıcaklık sınırı
	CE uygunluk işareti		Güneş ışığından uzak tutun
	Üretici		Kuru Yerde Tutun Yağmurdan uzak tutun
	Benzersiz Cihaz Tanımlayıcısı		İçindekiler
	Kullanım talimatlarına bakın		UKCA işareti
	İçeriği <n> test için yeterlidir		
	Katalog numarası		
	Parti kodu		
	Son kullanma tarihi		

1. Kullanım Amacı

FagoFlowEx Kit, akış sitometrisi ile tam kandaki solunum (oksidatif) patlamasını ölçerek nötrofil granüositlerin fagositik aktivitesinin belirlenmesi için tasarlanmıştır.

Tespit edilen ve/veya ölçülen nedir?

Cihaz, florojenik substrat Dihidrorhodamin 123 kullanarak aşağıdaki iki parametreyi tespit eder ve ölçer:

- *E. coli* bakterisinin alınmasına karşılık olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üreten nötrofil granüositlerinin yüzdesi
- ROS üreten enzimlerin intraselüler aktivitesi.

Cihazın işlevi

Cihaz, konjenital veya edinilmiş immün yetmezliğin taranması/teşhisine yardımcı olmak amacıyla tasarlanmıştır.

Fizyolojik veya patolojik durumun kapsamı

Nötrofil granüositlerin reaktif oksijen türlerinin üretimini katalize edememesi, tekrarlayan şiddetli bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar ve doku granülomu oluşumu ortak fenotipine sahip bir kalıtsal bozukluk grubu olan Kronik Granülomatöz Hastalığa (CGD) sebep olmaktadır ^(1, 2, 3, 4). CGD ile uyumlu sonuçlar, enfeksiyon insidansında artış olmadan genellikle normal bir fenotip olarak ortaya çıkan en yaygın fagosit defekti olan MPO eksikliğinden de kaynaklanabilir ⁽⁵⁾.

ROS üreten enzimlerde defekt olmadan fagositik aktivitede görülen azalma, primer değişken immün yetmezlikleri ve plazma opsonin yetmezlikleri veya sekonder immün yetmezlikleri gibi immünsüpresyona ilişkin farklı klinik durumlarda da ortaya çıkmaktadır ^(6, 7).

Test türü

Otomatik değil

Nicel

Gereken örnek türü

İnsan heparin-antikoagüle tam kanı

Test popülasyonu

Granüosit fonksiyon defekti şüphesi taşıyan bir hasta

2. Hedef kullanıcı

Cihaz yalnızca profesyonel laboratuvar kullanımı için tasarlanmıştır. Hasta başı testler veya kendi kendine yapılan testler için uygun değildir.

Yeterliliğe ilişkin gereklilikler

Hedef kullanıcı, insan hücrelerinin akış sitometrisi analizi, pipetleme becerileri dâhil

olmak üzere standart laboratuvar teknikleri, insan vücudundan elde edilen örneklerin güvenli ve uygun şekilde işlenmesi konularında son teknolojiye uygun uzmanlığa sahip olmalıdır.

Hedef kullanıcı EN ISO 15189 standardına veya varsa diğer ulusal hükümlere uymalıdır.

3. Test prensibi

Test, florojenik bir substrat olan Dihidrorhodamin 123 (DHR123) kullanılarak nötrofil granüositlerdeki ROS üretiminin ölçülmesine dayanmaktadır.

Test sırasında bir insan kanı örneği, ısıyla inaktive edilmiş *E. coli* bakterisi ve DHR123 kullanılarak inkübe edilir. Reaksiyon karışımı, nötrofil granüositler tarafından *E. coli* fagositozunun sağlanması için 37°C sıcaklığa getirilir. İnkübasyon sırasında bakteriler hücreler tarafından aktif olarak emilirken, floresan olmayan DHR123 ise konsantrasyon gradyanı sayesinde pasif olarak intraselüler ortama girer. Bakteriler hücresel fagozomların içine hapsolür ve ROS üretimiyle sonuçlanan enzimatik reaksiyonları tetikler. ROS iyonları DHR123'ü floresan rodamin 123'e (R123) okside eder ve kan örneğinin alınması sırasında bir akış sitometresinden gelen lazer ışını tarafından eksite edilir. R123'ten ROS üreten enzimlerin intraselüler aktivitesine karşılık gelen ışık emisyonu toplanır ve akış sitometresi ile analiz edilir.

E. coli stimülasyonuna paralel şekilde, *E. coli* içermeyen bir reaksiyon olan negatif kontrol reaksiyonu ve fagositoz yapmadan ROS üreten enzimleri aktiveştiren Forbol 12-miristat 13-asetat kullanılan bir reaksiyon olan pozitif kontrol reaksiyonu olmak üzere iki reaksiyon daha gerçekleştirilir.

Floresanları negatif kontrol reaksiyonundaki hücrelerin floresanını aşarsa hücrelerin aktif olarak fagosit olduğu kabul edilir. Sonuç, fagosit hücrelerin yüzdesi olarak raporlanır. Fagosit hücrelerin floresan yoğunluğu, ROS üreten enzimlerin intraselüler aktivitesiyle doğru orantılıdır.

4. Sağlanan reaktif/reaktifler

İçindekiler

FagoFlowEx Kit cihazı ile 100 test yapılabilir ve cihaz aşağıdaki reaktiflerle birlikte sağlanır:

E. coli (5 viyal), liyofilize *E. coli* bakterilerini içerir, 20 kan örneğinin stimülasyonu için 1 viyal yeterlidir (ED7042-1).

DHR123 (5 viyal), liyofilize Dihidrorhodamin 123 içerir, 1 viyal 60 kan örneğinin boyanması için yeterlidir (ED7042-2).

Stimulation Control (5 viyal), liyofilize PMA (Forbol 12-miristat 13-asetat) içerir, 1 viyal 20 pozitif kontrol testi için tasarlanmıştır (ED7042-3).

Lysing Solution (1 şişe) 15 ml kullanıma hazır solüsyon (ED7042-4) içeren.

5. Gereken ancak sağlanmayan malzemeler

Yuvarlak tabanlı test tüpleri (12 x 75 mm)

Deiyonize su (Reaktif dereceli)

6. Gerekli ekipman

Örnek ve reaktiflerin pipetlenmesi için tek kullanımlık uçlara (10-1000 µl) sahip otomatik pipet

Vorteks mikser

Test tüplerini 37 °C'de inkübe edebilen termostat (hava inkübatörü) veya su banyosu

Akış sitometresi lazer eksitasyon kaynağı (488 nm), saçılımlar için dedektörler, optik filtreler ve Tablo 1'de verilen florokromdan sinyal toplamak için uygun emisyon dedektörü.

Tablo 1 Cihazda kullanılan florokromun spektral özelliği

Florokrom	Eksitasyon [nm]	Emisyon [nm]
Rodamin 123	488	525

NOT: Cihaz, BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) ve Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation) akış sitometrelerinde test edilmiştir.

7. Depolama ve taşıma

2 – 8°C sıcaklıkta muhafaza edin.

Uzun süre ışığa maruz bırakılmaktan kaçının.



Dondurmayın.

Çalışma solüsyonlarının (varsa) saklama koşulları ve stabilitesinin yanı sıra ilk açılışından sonraki kullanım stabilitesi ve raf ömrü hakkında bilgi edinmek için Bölüm 10 Prosedür (Reaktif Hazırlama) kısmına bakın.

8. Uyarılar, önlemler ve kullanım kısıtlamaları

GHS Tehlike Sınıflandırması

UYARI: Lysing Solution (ED7042-4) tehlikeli olarak sınıflandırılan konsantrasyonlarda formaldehit (CAS No. 50-00-0) ve metanol (CAS No. 67-56-1) içerir.

Etiket öğeleri	Sinyal kelimesi
	Tehlike
	
H ifadeleri	<p>H302 Yutulması zararlıdır.</p> <p>H315 Ciltte tahrişe neden olur.</p> <p>H317 Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir.</p> <p>H319 Gözlerde ciddi tahrişe neden olur.</p> <p>H335 Solunum yollarında tahrişe neden olabilir.</p> <p>H341 Genetik bozukluklara neden olduğundan şüpheleniliyor.</p> <p>H350 Kansere neden olabilir.</p>
P ifadeleri	<p>P201 Kullanmadan önce özel talimatları edinin.</p> <p>P264 Kullandıktan sonra ellerinizi ve vücudunuzun açıkta kalan kısımlarını iyice yıkayın.</p> <p>P280 Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması kullanın.</p> <p>P301 + P312 YUTULMASI DURUMUNDA: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir doktora başvurun.</p> <p>P302 + P352 CİLTLE TEMAS ETMESİ DURUMUNDA: Bol su ve sabunla yıkayın.</p> <p>P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMAS ETMESİ DURUMUNDA: Birkaç dakika boyunca suyla iyice durulayın. Varsa ve çıkarması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulama işlemine devam edin.</p> <p>P308 + P313 Maruz kalınırsa veya maruz kaldığından endişelenilirse: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.</p> <p>P333 + P313 Ciltte tahriş veya kızarıklık oluşursa: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.</p> <p>P362 + P364 Kirlenen giysileri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın.</p>

Ürünün içerdiği kimyasal maddeler ve karışımların oluşturduğu riskler ve bunların nasıl ele alınması ve imha edilmesi gerektiği hakkında ayrıntılı bilgi için www.exbio.cz adresindeki ürün sayfasında yer alan Güvenlik Bilgi Formuna (SDS) bakın.

Biyolojik Tehlike

İnsan biyolojik numuneleri ve kan örnekleri ile bunlara temas eden her türlü madde her zaman bulaşıcı madde olarak kabul edilir.

Cilt, göz ve mukoza zarlarıyla temasını önlemek için kişisel koruyucu ekipman ve güvenlik ekipmanları kullanın.

Bulaşıcı maddelerin taşınması ve imha edilmesine ilişkin geçerli tüm yasa, yönetmelik ve prosedürlere uyun.

Bozulma belirtisi

Sağlanan liyofilize reaktiflerin normal görünümü beyaz bir toz (E. coli ve Stimülasyon Kontrolü) veya katı bir liyofilize kek şeklindedir (DHR123). Görünümde renk değişimi veya sıvılaşıma gibi herhangi bir değişiklik gözlemlerseniz reaktif kullanmayın.

Lizis solüsyonu normalde berrak bir sıvı şeklinde görünür. Görünümünde bulanıklık veya çökeltme belirtileri gibi herhangi bir değişiklik olduğunu gözlemlerseniz reaktif kullanmayın.

Kullanım kısıtlamaları

Ürün etiketlerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

9. Örnek

Tıbbi cihaz olarak sınıflandırılan ve heparin antikoagülan içeren örnek kabında toplanan venöz periferik kanı kullanın.

DİKKAT: EDTA ve sitrat antikoagülanları analiz sonuçlarını olumsuz etkiler.

Toplama tüpündeki kan örneği oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir. Buzdolabında muhafaza etmeyin.

Kan örneğini toplandıktan sonra en geç 24 saat içinde işleme alın.

10. Prosedür

Sağlanan reaktifin/reaktiflerin hazırlanması

E. coli

E. coli viyalinin içeriğini 250 µl deiyonize suda sulandırın. Her ölçüm günü taze olarak hazırlayın, 2-8°C'de saklayın ve sonraki 8 saat içinde kullanın. Alternatif olarak, reaktif -20°C ila -80°C sıcaklıkta dondurulabilir ve 7 gün içinde kullanılabilir.

DİKKAT: Tekrarlanan dondurma/çözme döngülerinden kaçının.

DHR123

DHR123 viyalinin içeriğini 650 µl deiyonize suda sulandırın. Her ölçüm günü taze olarak hazırlayın, 2-8°C'de saklayın ve sonraki 8 saat içinde kullanın. Alternatif olarak, reaktif -20°C ila -80°C sıcaklıkta dondurulabilir ve 7 gün içinde kullanılabilir.

NOT: Alikotlanan solüsyon 5 dondurma/çözme döngüsüne kadar dayanabilir.

Stimulation Control

Stimülasyon Kontrolünün içeriğini 250 µl deiyonize suda sulandırın. Her ölçüm günü taze olarak hazırlayın, 2-8°C'de saklayın ve sonraki 8 saat içinde kullanın. Alternatif olarak, reaktif -20°C ila -80°C sıcaklıkta dondurulabilir ve 7 gün içinde kullanılabilir.

NOT: Alikotlanan solüsyon 5 dondurma/çözme döngüsüne kadar dayanabilir.

Lysing Solution

Reaktif kullanıma hazırdır.

NOT: Reaktifi kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin.

Örnek boyama

1. Bir hastanın muayenesinde, üç adet 12 x 75 mm yuvarlak tabanlı test tüpünü uygun örnek tanımlamasıyla etiketleyin ve aşağıdakileri işaretleyin

E. coli ile stimüle edilmiş reaksiyon,

pozitif kontrol reaksiyonu (PMA stimülasyonu)

ve negatif kontrol reaksiyonu.

Tülerin dibine aşağıdaki şekilde pipetleme yapın:

- E. coli ile stimüle edilmiş reaksiyon olarak işaretlenen tüpe 10 µl E. coli pipetleyin.
 - Pozitif kontrol reaksiyonu olarak işaretlenen tüpe 10 µl Stimülasyon Kontrolü pipetleyin.
 - Negatif kontrol reaksiyonu olarak işaretlenen tüpe hiçbir şey pipetlemeyin.
2. Test tüplerinin her birinin dibine 50 µl iyice karıştırılmış kan örneği pipetleyin ve hafifçe karıştırın.

DİKKAT: Test tüpünün yan tarafına kan damlatmaktan kaçının. Tüpün kenarında kan lekesi veya damlacık kalırsa reaktifle boyanmayabilir veya eritrositler çözünmeyebilir ve test sonucu doğru olmayabilir.

3. Test tüplerinin her birinin dibine 10 µl DHR123 pipetleyin ve hafifçe karıştırın.

4. Test tüplerini su banyosunda 20 dakikalığına veya hava inkübatöründe 30 dakikalığına 37°C'ye ayarlayın.
5. Test tüplerinin her birine 50 µl Lysing Solution ekleyin. Yavaşça karıştırın ve test tüplerini karanlıkta oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edin.
6. Her bir test tüpüne 1 ml deiyonize su ekleyin, hafifçe karıştırın ve karanlıkta oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edin.
7. Boyalı örneği anında akış sitometresinden alın. Boyalı örnek hemen alınmayacaksa test tüpünün kapağını kapatın, 2 – 8°C sıcaklıkta karanlık ortamda saklayın ve 2 saat içinde analiz edin.

DİKKAT: DHR123'ün oksidasyonu ile üretilen Rodamin 123'ün floresanı FITC kanalında (525 nm) tespit edilir. Rodamin 123, Şekil 8'de gösterildiği üzere granüositlerden hızla salındığı için örneklerin **mümkün olan en kısa sürede** (lizisten sonra en geç 2 saat içinde), tercihen **standardize edilmiş kısıtlı bir zaman aralığında** ölçülmesi gerekir (sayfa 18'e bakın).

DİKKAT: Topaklanmaları önlemek için akış sitometresinde görüntü almadan hemen önce boyalı örneği karıştırın.

Akış sitometrisi analizi

FagoFlowEx Kit cihazı ile kullanılmak üzere seçilen akış sitometresi, sitometre üreticisinin talimatlarına göre dedektörlerin sabit hassasiyetini sağlamak için floresan mikro boncuklar kullanılarak rutin olarak kalibre edilmelidir.

Akış sitometresinin bakımı düzgün yapılmazsa yanlış sonuçlar verebilir.

Gerekli ekipman başlıklı Bölüm 6'daki florokromların eksitasyon ve emisyon özelliklerine uygun lazerler ve floresan dedektörleri için üreticinin sitometre spesifikasyonlarına bakın.

Boyalı örnek analizinden önce ilgili floresan dedektörlerindeki gerilimleri ayarlayın. PMT dedektöründeki gerilim yeterli düzeyde yüksek ayarlanmalı, böylece en az negatif boyalı olay floresan eksenindeki 0. kanalla etkileşime girmelidir. PMT dedektörü gerilimi de pozitif olayların sağ eksene baskılandığı değerleri aşmamalıdır.

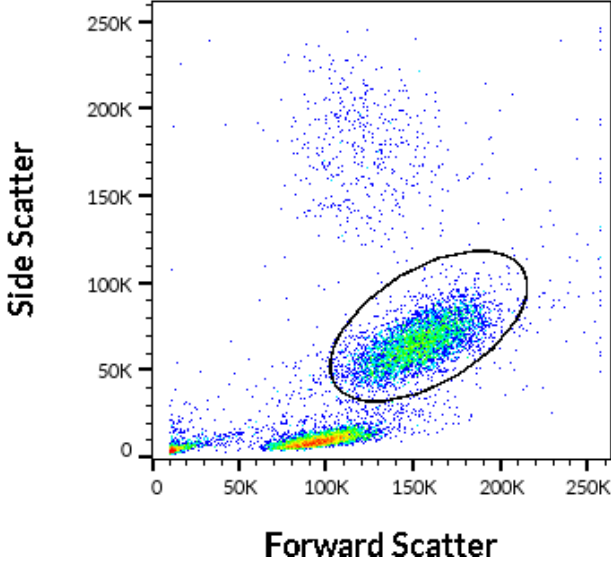
Ölçülen veri analizi için üretici tarafından geliştirilen sitometre yazılımı veya çevrim dışı sitometri veri analizine özel yazılım (örneğin FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™) kullanılabilir.

Bir hasta örneğinin analizi

En az 5.000 – 10.000 lökosit olayı elde edin. Elde edilen olayları yana saçılım (SSC) ve öne saçılım (FSC) noktasal grafiğinde görselleştirin. Granülositlerin etrafındaki geçidi Şekil 1'de gösterildiği gibi ayarlayın.

DİKKAT: Bakterilerin yutulması granülositlerin SSC-FSC noktasal grafiğindeki konumunu etkiler. Bu nedenle geçidi her reaksiyon için ayrı olarak ayarlayın.

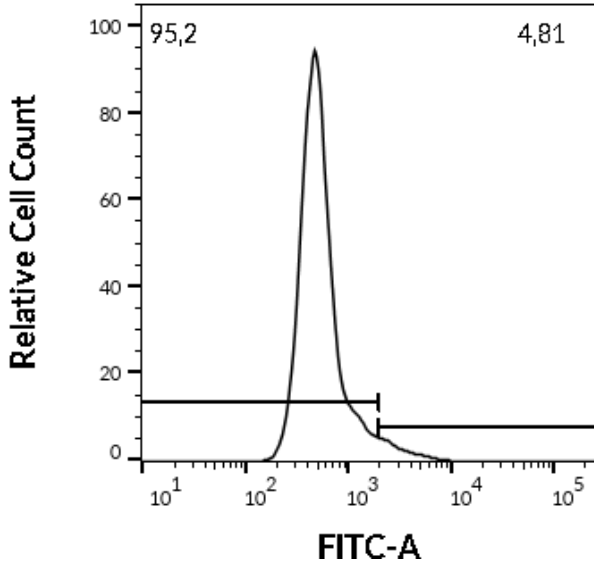
Şekil 1 Granülosit popülasyonunu grafiği



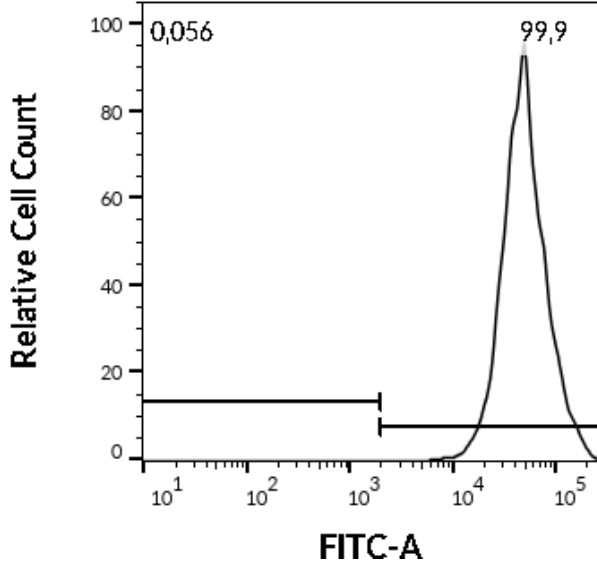
Geçitli granüositleri, X ekseninin FITC kanalındaki floresan yoğunluğunu belirttiği histogramlar şeklinde görselleştirin. Pozitif (aktif olarak fagosit olan ve ROS üreten hücreler) ve negatif (fagosit olmayan ve ROS üretmeyen hücreler) granüositleri birbirinden ayırmak üzere uygun bir geçit oluşturmak için negatif kontrol reaksiyonunu kullanın. Geçidi E. coli stimülasyon reaksiyonuna ve pozitif kontrol reaksiyonuna kopyalayın (Şekil 2a, 2b, 2c).

Oksidatif patlamaya uğrayan granüositler Rodamin 123'ün parlak floresanını ortaya çıkarır. Pozitif ve negatif granüositlerin ortalama floresan yoğunluğunu hesaplayın. Floresan yoğunluğu, ROS üreten enzimlerin intraselüler aktivitesi ile doğru orantılıdır.

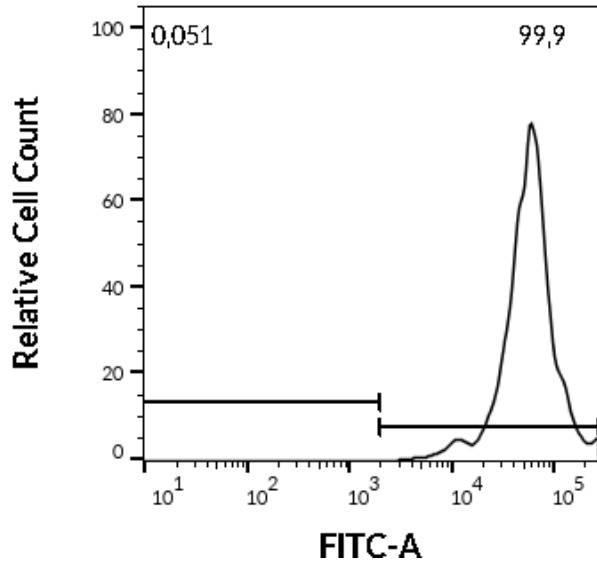
Şekil 2a Negatif kontrol reaksiyonundan elde edilen granüosit floresan yoğunluğunun histogramı



Şekil 2b E. coli ile stimüle edilmiş reaksiyondan elde edilen granülosit floresan yoğunluğunun histogramı



Şekil 2c Pozitif kontrol reaksiyonunda elde edilen granülosit floresan yoğunluğunun histogramı



Analitik sonuçların hesaplanması ve yorumlanması

Nicel parametreler

İki nicel parametre rapor edilmiş ve fagositik aktivitede bir defekt veya ROS üretiminde bir defekt belirtisi olup olmadığı açısından yorumlanmıştır:

a) **E. coli stimülasyonunun ardından solunum patlaması gösteren pozitif granülositlerin** göreceli sayısı.

b) **Stimülasyon endeksi (SI)**, *E. coli* ile stimüle edilen reaksiyonun pozitif granülositleri ile negatif kontrol reaksiyonunun negatif granülositlerinin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) oranı üzerinden hesaplanmıştır.

Stimülasyon Endeksi hesaplaması örneği

Tablo 2 Negatif kontrol reaksiyonu: Negatif ve pozitif granülositlerin MFI değeri

Popülasyon	Sayı (%)	Ortalama FITC-A
negatif	95,2	550
pozitif	4,81	3995

Tablo 3 *E. coli* ile stimüle edilmiş reaksiyon: Negatif ve pozitif granülositlerin MFI değeri

Popülasyon	Sayı (%)	Ortalama FITC-A
negatif	0,056	1224
pozitif	99,9	53836

E. coli ile stimüle edilmiş reaksiyondan elde edilen pozitif granülositlerin MFI değerinin oranı (Tablo 3), negatif kontrol reaksiyonundan elde edilen negatif granülositlerin MFI değerine bölünür (Tablo 2).

$$\frac{\text{E.coli ile uyarılmış reaksiyondan pozitif granülositlerin MFI değeri}}{\text{Negatif kontrol reaksiyonundan negatif granülositlerin MFI değeri}} =$$

$$\frac{53836}{550} = \text{SI (Stimülasyon Endeksi)} = 98$$

Nitel parametreler

Nitel veri yorumlaması, sinyal dağılımını değerlendirmek ve birden fazla granülosit popülasyonunun meydana gelmesi durumunda ayrı olarak analiz edilmesi gereken bireysel tepe noktalarını tanımlamak amacıyla histogram katmanlarını içerir.

Solunum patlaması defektleri (DHR123'ün oksidasyon eksikliği) durumunda, ortaya çıkan granülosit histogramları *E. coli* stimülasyon reaksiyonu ile pozitif kontrol reaksiyonu arasındaki sinyal dağılımı uyumunu ortaya koyacaktır (Şekil 4, 5, 6).

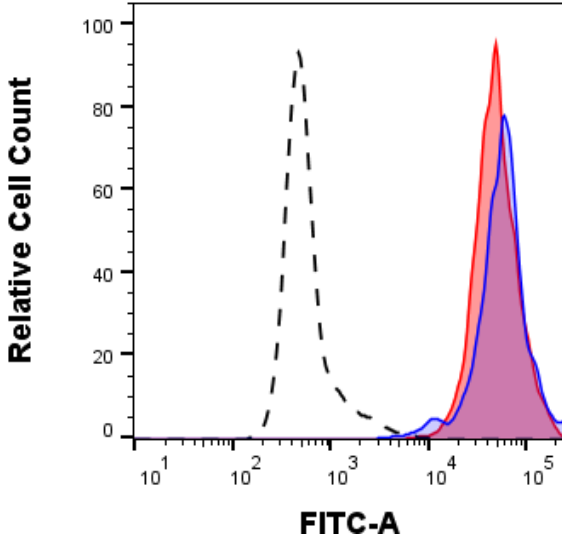
Fagositik aktivite defektleri (partikül alımının azalması) durumunda, ortaya çıkan granülosit histogramları *E. coli* stimülasyon reaksiyonu ile pozitif kontrol reaksiyonu arasındaki sinyal dağılımı tutarsızlığını ortaya koyacaktır. *E. coli* ile stimüle edilen reaksiyonda granülosit popülasyonu farklı floresan yoğunluklarına sahip birden fazla tepe noktasına bölünecektir, pozitif kontrol reaksiyonunda ise tek bir tepe noktası olacaktır (Şekil 7).

NOT: Olağan dışı sonuçların tespit edilmesi, yalnızca diğer testler ile doğrulanması gereken hastalık şüphesinin varlığına işaret eder.

Sağlıklı donörün normal sonucu

Granülositler hem *E. coli* hem de pozitif kontrol reaksiyonu ile stimüle edildikten sonra yüksek solunum patlaması gösterir (Şekil 3).

Şekil 3 Histogram katmanı: Solunum patlaması defekti olmayan sağlıklı donör, (SI = 98, pozitif granülositlerin rölatif sayısı %99,9). *E. coli* ile stimüle edilmiş granülositlerin (içi kırmızıyla boyanmış), negatif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (siyahla çizilmiş) ve pozitif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (içi maviyle boyanmış) FITC dedektöründeki sinyal dağılımı.



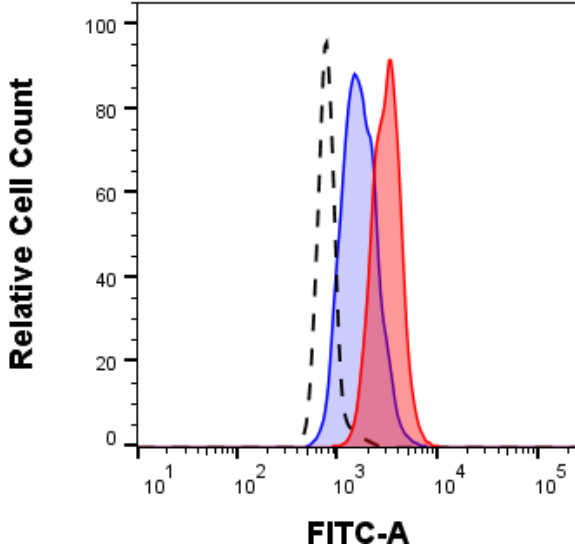
Solunum patlaması defektine işaret eden sonuçlar

1) Düşük sinyal yoğunluğuna sahip tek tepe noktası

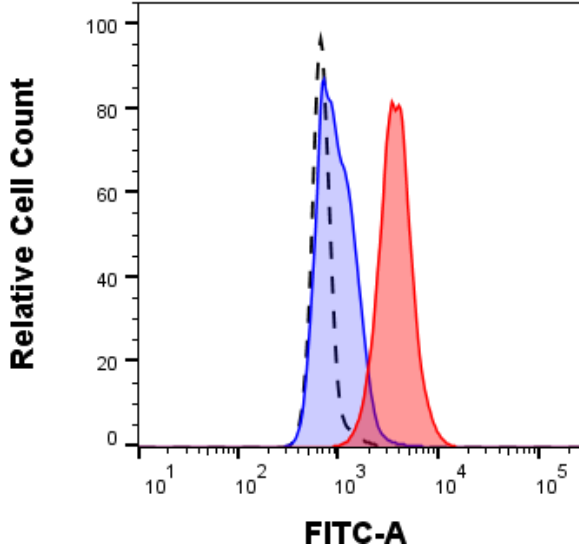
Granülositler hem *E. coli* hem de pozitif kontrol reaksiyonu ile stimüle edildikten sonra düşük solunum patlaması gösteriyorsa bu durum **miyeloperoksidaz (MPO) eksikliğine** (Şekil 4) veya daha az yaygın olan **kronik granüloamatöz hastalığına (CGD)** işaret eder (Şekil 5). CGD'deki solunum patlamasının yoğunluğu, NADPH oksidaz enzim kompleksinde meydana gelen mutasyona bağlıdır. Hastalığın beş otozomal resesif tipi (1 – 5) ve bir X'e bağlı resesif tipi vardır.

DİKKAT: Test, CGD ve MPO eksikliği arasında farklılık gösteremez.

Şekil 4 Histogram katmanı: MPO eksikliğine sahip hasta, (SI = 11, pozitif granülositlerin göreceli sayısı %89,7). *E. coli* ile stimüle edilmiş granülositlerin (içi kırmızıyla boyanmış), negatif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (siyahla çizilmiş) ve pozitif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (içi maviyle boyanmış) FITC dedektöründeki sinyal dağılımı.



Şekil 5 Histogram katmanı: X'e bağlı CGD'ye sahip erkek hasta, (SI = 16, pozitif granülositlerin göreceli sayısı %99). E. coli ile stimüle edilmiş granülositlerin (içi kırmızıyla boyanmış), negatif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (siyahla çizilmiş) ve pozitif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (içi maviyle boyanmış) FITC dedektöründeki sinyal dağılımı.

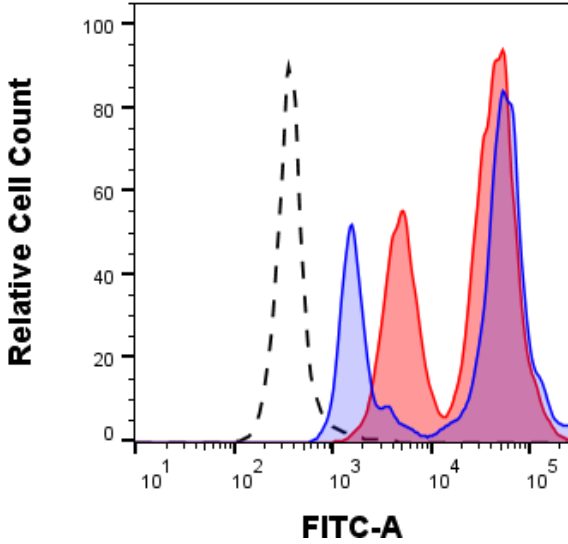


2) Farklı sinyal yoğunluğuna sahip iki tepe noktası

Bir kadın hastanın granülositleri hem *E. coli* hem de pozitif kontrol reaksiyonu ile stimüle edildikten sonra solunum patlaması yoğunluğu açısından farklılık gösteren **iki alt popülasyon ortaya koyarsa** (Şekil 6) bu durum hastanın X'e bağlı CGD taşıyıcısı olduğunu gösterir.

DİKKAT: Histogramda üç ve daha fazla tepe noktası olması, SSC ve FSC noktasal grafiğindeki (Şekil 1) granülosit popülasyon geçidinin monositlerle veya fagositik olmayan ölü hücrelerle kontamine olduğunu gösterir.

Şekil 6 Histogram katmanı: NADPH oksidaz geninde X'e bağlı mutasyon taşıyan kadın. İki granülosit alt popülasyonu solunum patlaması yoğunluğu bakımından farklılık göstermektedir (düşük MFI tepe noktası SI = 14, granülositlerin göreceli sayısı %35, yüksek MFI tepe noktası SI = 125, granülositlerin göreceli sayısı %65). *E. coli* ile stimüle edilmiş granülositlerin (içi kırmızıyla boyanmış), negatif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (siyahla çizilmiş) ve pozitif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (içi maviyle boyanmış) FITC dedektöründeki sinyal dağılımı.

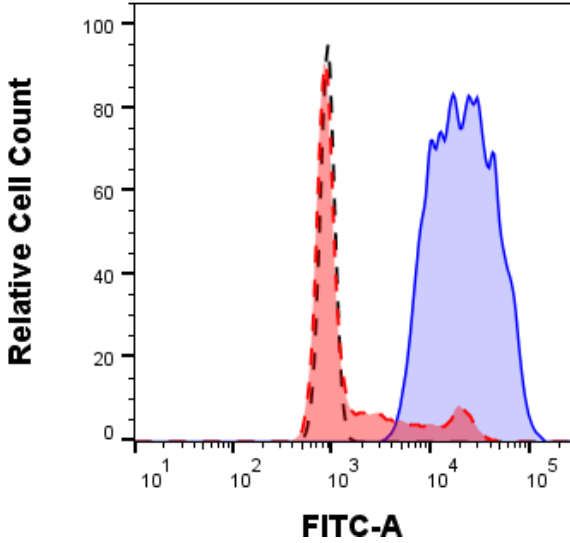


Fagositik aktivite defektine işaret eden sonuçlar

Pozitif kontrol reaksiyonu ve *E. coli* ile stimüle edilmiş reaksiyon arasındaki farklı tepe noktası modeli

E. coli ile stimüle edilen granülositler düşük solunum patlaması gösteriyor ve pozitif kontrol reaksiyonu ile stimüle edilen granülositler yüksek solunum patlaması gösteriyorsa (Şekil 7) bu durum, granülosit fagositik aktivitesinde bir defekt olduğunu, ayrıca kan örneğinin antikoagülan EDTA veya sitrat içerdiğini ya da örneğin eski olduğunu veya yanlış saklandığını belirtir.

Şekil 7 Histogram katmanı: EDTA ile antikoagüle edilmiş örnek (düşük MFI tepe noktası SI = 1, göreceli granülosit sayısı %73, yüksek MFI tepe noktası SI = 25, göreceli granülosit sayısı %9). *E. coli* ile stimüle edilmiş granülositlerin (içi kırmızıyla boyanmış), negatif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (siyahla çizilmiş) ve pozitif kontrol reaksiyonundan elde edilen granülositlerin (içi maviyle boyanmış) FITC dedektöründeki sinyal dağılımı.



11. Analitik performans

Keskinlik (tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik)

Testin **yeniden üretilebilirliği**, aynı deneysel koşullar altında aynı günde sağlıklı kan bağışçılarından alınan altı kan örneğini analiz eden beş operatör tarafından elde edilen veriler kullanılarak belirlenmiştir.

Aşağıdaki parametreler hesaplanmıştır:

a) Pozitif granülositlerin göreceli sayısının belirlenmesi için

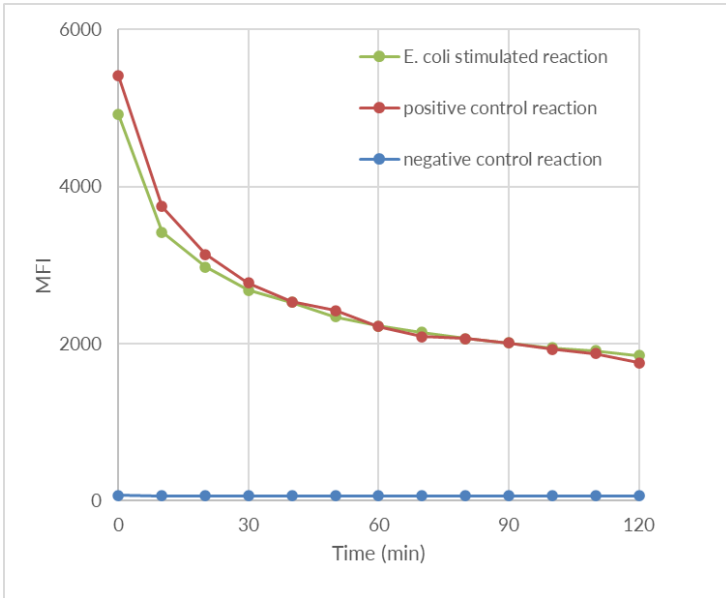
CV = %2

b) Stimülasyon endeksinin belirlenmesi için

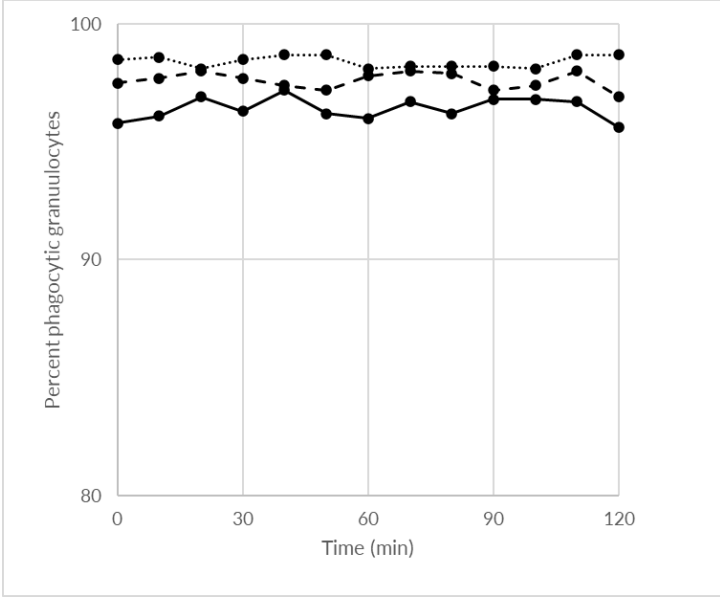
CV = %11

Testin **tekrarlanabilirliği** belirlenmemiştir. R123'ün hücrelerden salınmasıyla ilişkili MFI değişikliklerinin dinamiği nedeniyle (Şekil 8, 9, 10) tekrarlanabilirlik değerleri, örnek işlemenin sonu (fiksasyon/RBC lizisi) ve FACS analizi arasında geçen süreye bağlı olacaktır. Analizin küçük örnek serileri üzerinde ve standardize edilmiş dar zaman aralığında yapılması tavsiye edilir. Alternatif olarak, MFI değişkenliğinin en aza indirilmesi açısından daha uzun bir zaman aralığının ardından (40 dakika) daha büyük seriler analiz edilebilir.

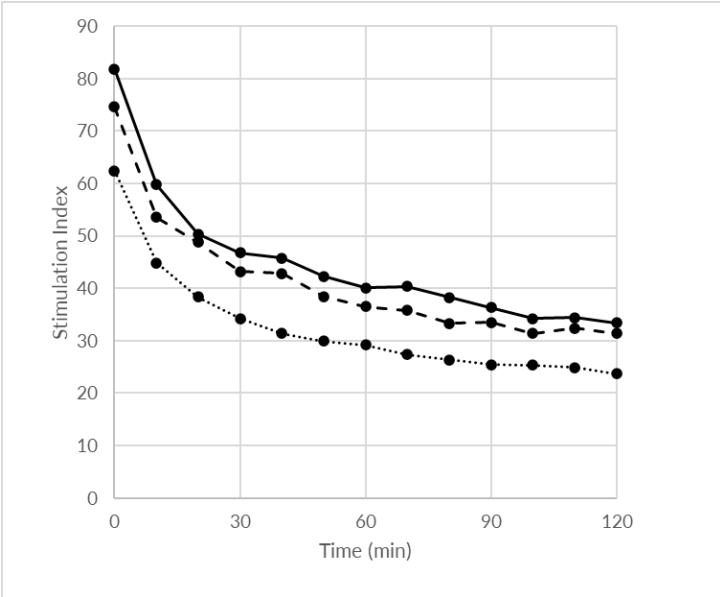
Şekil 8 Granülosit ortalama floresan yoğunluğunun (MFI) kırmızı kan hücresi lizisi sonrasında zamanla gelişimi, örnek olarak bir kan örneği (sağlıklı donör).



Şekil 9 Granülosit fagositik aktivitesinin (%) kırmızı kan hücresi lizisinden sonra zaman içerisindeki gelişimi, 3 farklı kan örneği (sağlıklı donörler).



Şekil 10 Stimülasyon Endeksinin kırmızı kan hücresi lizisinden sonra zaman içerisindeki gelişimi, 3 farklı kan örneği (sağlıklı donörler).



12. Klinik performans

Test, toplam 47 hastadan alınan örnekler kullanılarak PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) ile yapılan karşılaştırmalı ölçümlerle değerlendirilmiştir (Tablo 4). Her iki kit şunları tespit edebilmiştir: a) partikül alımında başarısızlık (düşük fagositik aktivite) ve b) %100 hassasiyet ve %100 özgüllüğe sahip oksidatif patlama bozuklukları (MPO eksikliği, CGD).

Tablo 4 Performans değerlendirme çalışmasındaki hasta özellikleri

Hasta özellikleri	n
Sağlıklı donör (ilişkısiz immünolojik bozukluk)	40
CGD (2 hasta ve bir CGD taşıyıcısı)	3
MPO eksikliği	2
Düşük fagositik aktivite (hastalık modeli - EDTA antikoagülanı)	2
Eski örnekler (sağlıklı donörlerin 48 saat içindeki tekrarlayan ölçümleri)	4

13. Beklenen değerler

Granüositlerin solunum patlaması etkinliğinin normal aralığı, sağlıklı yetişkinlerden alınan 40 periferik kan örneğinde incelenmiştir.

- Solunum patlaması aktivitesi olan granüositler
%90 - 100
- Granüositlerin stimülasyon endeksi > 30
3· yüzdellik dilim = 31
Medyan = 56
97· yüzdellik dilim = 97

Stimülasyon endeksi farklı laboratuvarlarda ve cihazlarda değişiklik gösterebileceği için her laboratuvar yerel normal donör popülasyonundan alınan örnekler üzerinde kendi test koşullarını kullanarak normal aralığı BELİRLEMELİDİR.

14. Müdahale eden maddeler ve kısıtlamalar

EDTA ve sitrat antikoagülanları analiz sonuçlarını olumsuz etkiler.

15. Referanslar

- 1) Dinuer 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., Styrk, 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. Ticari markalar

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, BD Multitest™ ve FlowJo™; Becton, Dickinson and Company'nin tescilli ticari markalarıdır, Sysmex™, Sysmex Corporation'ın tescilli ticari markasıdır, VenturiOne®, Applied Cytometry'nin tescilli ticari markasıdır, Infinicyt™, Cytognos S.L.'nin tescilli ticari markasıdır.

17. Revizyon Geçmişi

Versiyon 8, ED7042_IFU_v8

Kullanım kılavuzu düzeni değiştirildi.

18. Üretici

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Çek Cumhuriyeti

İletişim Bilgileri

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

19. Yetkili Temsilciler

N/A

NOT: Cihaza ilişkin olarak meydana gelen herhangi bir ciddi olay üreticiye ve yerel yetkili makama bildirilmelidir.