

exbio

FagoFlowEx Kit

100 testów | Nr kat. ED7042



Instrukcja użycia (PL)

Wersja: ED7042_IFU_v8_PL

Data wydania: 14.04.2023 r.

Symbole stosowane w oznakowaniu urządzeń

	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Ograniczenie temperatury
	Znak zgodności CE		Przechowywać poza zasięgiem światła słonecznego
	Producent		Utrzymywać w suchości Chronić przed deszczem
	Unikalny identyfikator urządzenia		Zawartość
	Zapoznaj się z instrukcją użycia		Znak UKCA
	Zawiera ilość wystarczającą na <n> testów		
	Numer katalogowy		
	Kod partii		
	Termin przydatności do użycia		

1. Przeznaczenie

FagoFlowEx Kit jest przeznaczony do oznaczania aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych poprzez pomiar wyrzutu oddechowego (oksydacyjnego) w krwi pełnej metodą cytometrii przepływowej.

Co jest wykrywane i/lub mierzone

Urządzenie wykrywa i mierzy dwa parametry za pomocą substratu fluorogenego Dihydrorodamina 123:

- odsetek granulocytów obojętnochłonnych wytwarzających reaktywne formy tlenu (ROS) w odpowiedzi na spożycie bakterii *E. coli*
- aktywność wewnątrzkomórkową enzymów wytwarzających ROS.

Funkcja urządzenia

Urządzenie jest przeznaczone do badań przesiewowych/pomocy w diagnostyce wrodzonych lub nabytych niedoborów odporności.

Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego

Niezdolność granulocytów obojętnochłonnych do katalizowania produkcji reaktywnych form tlenu powoduje przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD), grupę dziedzicznych zaburzeń ze wspólnym fenotypem nawracających ciężkich infekcji bakteryjnych i grzybiczych oraz tworzenie się ziarniniaków tkankowych ^(1, 2, 3, 4). Wyniki zgodne z CGD mogą również pochodzić z niedoboru MPO, który jest najczęstszym defektem fagocytów, objawiającym się zwykle jako prawidłowy fenotyp bez zwiększonej częstości występowania infekcji ⁽⁵⁾.

Spadek aktywności fagocytarnej bez defektu enzymów wytwarzających ROS występuje w różnych innych stanach klinicznych, które są związane z supresją immunologiczną albo pierwotnymi niedoborami odporności zmiennej i niedoborami opsoniny osocza, bądź wtórnymi niedoborami odporności ^(6, 7).

Rodzaj testu

Nie zautomatyzowany

Ilościowy

Wymagany rodzaj próbki

Ludzka krew pełna antykoagulowana heparyną

Populacja testowa

Pacjent z podejrzeniem defektu funkcji granulocytów

2. Użytkownik

Urządzenie jest przeznaczone wyłącznie do profesjonalnego użytku laboratoryjnego. Nie służy do badań przyłóżkowych ani do samodzielnych badań.

Wymagania dotyczące kwalifikacji

Docelowy użytkownik powinien posiadać najnowszą wiedzę specjalistyczną w zakresie analizy cytometrii przepływowej komórek ludzkich, standardowych technik laboratoryjnych, w tym umiejętności pipetowania oraz bezpiecznego i właściwego obchodzenia się z próbkami pobranymi z organizmu ludzkiego.

Docelowy użytkownik musi przestrzegać normy EN ISO 15189 lub innych norm krajowych jeśli takowe istnieją.

3. Zasada testu

Test opiera się na pomiarze produkcji ROS w granulocytach obojętnochłonnych przy użyciu substratu fluorogennego Dihydrorodamina 123 (DHR123).

Podczas testu próbka ludzkiej krwi jest inkubowana z inaktywowanymi termicznie bakteriami *E. coli* oraz z DHR123. Mieszaninę reakcyjną doprowadza się do temperatury 37°C w celu wzmożenia fagocytozy *E. coli* przez granulocyty obojętnochłonne. Podczas inkubacji bakterie są aktywnie pochłaniane przez komórki, podczas gdy niefluorescencyjna DHR123 biernie wchodzi do środowiska wewnątrzkomórkowego poprzez swój gradient stężeń. Bakterie zostają uwięzione w fagosomach komórkowych i wyzwalają reakcje enzymatyczne, w wyniku których powstaje ROS. Jony ROS utleniają DHR123 do fluorescencyjnej rodaminy 123 (R123), która jest wzbudzana wiązką laserową z cytometru przepływowego podczas pobierania próbki krwi. Późniejsza emisja światła z R123 odpowiadająca wewnątrzkomórkowej aktywności enzymów wytwarzających ROS jest zbierana i analizowana za pomocą cytometru przepływowego.

Równoległe ze stymulacją *E. coli* przeprowadza się dwie inne reakcje, negatywną kontrolę reakcji, która jest reakcją bez *E. coli*, oraz pozytywną kontrolę reakcji, która jest reakcją wykorzystującą 12-mirystynian 13-octanu forbolu, który aktywuje enzymy wytwarzające RFT bez fagocytozy.

Komórki uważa się za aktywnie fagocytujące, jeśli ich fluorescencja przekracza fluorescencję komórek z negatywnej kontroli reakcji. Wynik podaje się jako procent fagocytujących komórek. Intensywność fluorescencji komórek fagocytujących jest wprost proporcjonalna do wewnątrzkomórkowej aktywności enzymów wytwarzających ROS.

4. Dostarczone odczynniki

Zawartość

Urządzenie FagoFlowEx Kit, wystarczające na wykonanie 100 testów, dostarczane jest z następującymi odczynnikiemami:

E. coli (5 fiolek) zawierający liofilizowaną bakterię *E. coli*, 1 fiołka wystarcza do stymulacji 20 próbek krwi (ED7042-1).

DHR123 (5 fiolek) zawierający liofilizowaną dihydrorodaminę 123, 1 fiołka

wystarcza do barwienia 60 próbek krwi (ED7042-2).

Stimulation Control (5 fiolek) zawierający liofilizowany PMA (12-mirystynian-13-octan furbolu), 1 fiołka jest przeznaczona na 20 testów kontroli pozytywnej (ED7042-3).

Lysing Solution (1 butelka) zawierający 15 ml roztworu gotowego do użycia (ED7042-4).

5. Materiały wymagane, nie będące w zestawie

Probówki okrągłodenne (12 x 75 mm)

Woda dejonizowana (do odczytników)

6. Wymagany osprzęt

Pipeta automatyczna z jednorazowymi końcówkami (10 – 1000 μ l) do pipetowania próbek i odczytników

Mieszadło wirowe

Termostat (inkubator powietrzny) lub łaźnia wodna umożliwiająca inkubację próbek w temperaturze 37°C

Źródło wzbudzenia lasera cytometru przepływowego (488 nm), detektory rozpraszania, filtry optyczne i detektor emisji odpowiedni do zbierania sygnału z fluorochromu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka widmowa fluorochromu użytego w urządzeniu

Fluorochrom	Wzbudzenie [nm]	Emisja [nm]
Rodamina 123	488	525

UWAGA: urządzenie zostało przetestowane na cytometrach przepływowych BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) i Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Przechowywanie

Przechowywać w temperaturze 2–8°C.

Unikać długotrwałej ekspozycji na światło.



Nie zamrażać.

Patrz punkt 10 Procedura (Przygotowanie odczynników), aby uzyskać informacje na temat stabilności podczas użycia i okresu ważności po pierwszym otwarciu, a także warunków przechowywania i stabilności roztworów roboczych (jeśli dotyczy).

8. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia użytkowania

Klasyfikacja zagrożeń GHS

OSTRZEŻENIE: Lysing Solution (ED7042-4) zawiera formaldehyd (nr CAS 50-00-0) i metanol (nr CAS 67-56-1) w stężeniach sklasyfikowanych jako niebezpieczne.

Elementy etykiety	Hasło ostrzegawcze
	Niebezpieczeństwo
	
Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia	H302 Działa szkodliwie po połknięciu. H315 Działa drażniąco na skórę. H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry. H319 Działa drażniąco na oczy. H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. H341 Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne. H350 Może powodować raka.
Zwroty wskazujące środki ostrożności	P201 Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi instrukcjami. P264 Dokładnie umyć ręce i odsonięte części ciała po użyciu. P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu. P301+P312 W PRZYPADKU POŁKNIĘCIA: W przypadku złego samopoczucia wezwać lekarza. P302+P352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. P305+P351+P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Usunąć soczewki kontaktowe, jeśli są używane i łatwo można je wyjąć. Kontynuować płukanie. P308+P313 W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P333+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362+P364 Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.

Zapoznaj się z kartą charakterystyki (SDS) dostępną na stronie produktu pod adresem www.exbio.cz, aby uzyskać pełne informacje na temat zagrożeń stwarzanych przez substancje chemiczne i mieszaniny zawarte w produkcie oraz jak należy się z nimi obchodzić i jak je utylizować.

Zagrożenie biologiczne

Ludzkie próbki biologiczne i próbki krwi oraz wszelkie materiały mające z nimi kontakt są zawsze uważane za materiały zakaźne.

Stosować środki ochrony osobistej i bezpieczeństwa, aby uniknąć kontaktu ze skórą, oczami i błonami śluzowymi.

Postępuj zgodnie ze wszystkimi obowiązującymi przepisami prawa, regulacjami i procedurami dotyczącymi obchodzenia się z materiałami zakaźnymi i ich usuwania.

Oznaki pogorszenia jakości

Normalny wygląd dostarczonych liofilizowanych odczynników to biały proszek (*E. coli* i Kontrola stymulacji) lub stały liofilizowany placek (DHR123). Nie używać odczynnika w przypadku zauważenia jakichkolwiek zmian w wyglądzie, na przykład zmian koloru lub upłynnienia.

Normalny wygląd roztworu do lizy to klarowny płyn. Nie używać odczynnika w przypadku zauważenia jakiegokolwiek zmiany w jego wyglądzie, na przykład zmętnienia lub osadu.

Ograniczenie użytkowania

Nie stosować po upływie daty ważności podanej na etykiecie produktu.

9. Próbka

Stosować żyłą krew obwodową pobraną do pojemnika na próbki sklasyfikowanego jako wyrób medyczny, z obecnością antykoagulantu heparyny.

UWAGA: antykoagulanty EDTA i cytryniany mają negatywny wpływ na wyniki analizy.

Próbka krwi w probówce do pobierania musi być przechowywana w temperaturze pokojowej. Nie przechowywać w lodówce.

Próbkę krwi należy poddać obróbce nie później niż 24 godziny po pobraniu.

10. Procedura

Przygotowanie dostarczonych odczynników

E. coli

Odtworzyć zawartość fiołki *E. coli* w 250 µl dejonizowanej wody. Każdego dnia pomiarowego przygotowywać świeży materiał, przechowywać w temperaturze 2-8°C i zużyć w ciągu następnych 8 godzin. Alternatywnie, odczynnik można

zamrozić w temp. od -20°C do -80°C i zużyć w ciągu 7 dni.

UWAGA: unikać powtarzających się cykli zamrażania/rozmrężania.

DHR123

Rozpuścić zawartość fiołki DHR123 w 650 µl dejonizowanej wody. Każdego dnia pomiarowego przygotowywać świeży materiał, przechowywać w temperaturze 2-8°C i zużyć w ciągu następnych 8 godzin. Alternatywnie, odczynnik można zamrozić w temp. od -20°C do -80°C i zużyć w ciągu 7 dni.

UWAGA: roztwór podzielony na porcje wytrzymałe do 5 cykli zamrażania/rozmrężania.

Stimulation Control

Odtworzyć zawartość Kontroli stymulacji w 250 µl dejonizowanej wody. Każdego dnia pomiarowego przygotowywać świeży materiał, przechowywać w temperaturze 2-8°C i zużyć w ciągu następnych 8 godzin. Alternatywnie, odczynnik można zamrozić w temp. od -20°C do -80°C i zużyć w ciągu 7 dni.

UWAGA: roztwór podzielony na porcje wytrzymałe do 5 cykli zamrażania/rozmrężania.

Lysing Solution

Odczynnik jest gotowy do użycia.

UWAGA: przed użyciem doprowadzić odczynnik do temperatury pokojowej.

Barwienie próbek

1. W celu zbadania jednego pacjenta należy oznaczyć trzy okrągłodenne próbki o wymiarach 12 x 75 mm odpowiednimi danymi identyfikacyjnymi i oznaczeniami dla

**reakcji stymulowanej przez E. coli,
pozytywnej kontroli reakcji (stymulacja PMA),
i negatywnej kontroli reakcji.**

Wprowadzić pipetą

- 10 µl E. coli na dno próbki oznaczonej jako reakcja stymulowana przez E. coli.
- 10 µl Kontroli stymulacji na dno próbki oznaczonej jako pozytywna kontrola reakcji.
- Nie wprowadzać niczego na dno próbki oznaczonej jako negatywna kontrola reakcji.

2. Odpipetować 50 µl dobrze wymieszanej próbki krwi na dno każdej z probówek i delikatnie wymieszać.

UWAGA: unikać pipetowania krwi po ściance probówki. Jeśli na boku probówki pozostanie rozsmaz krwi lub kropla, może ona nie zostać zabarwiona odczynnikami lub erytrocyty mogą nie ulec lizie, przez co wynik testu może być nieważny.

3. Odpipetować 10 µl DHR123 na dno każdej z probówek i delikatnie wymieszać.
4. Umieścić probówki w temperaturze 37°C na 20 minut w łaźni wodnej lub na 30 minut w inkubatorze powietrznym.
5. Dodać 50 µl roztworu do lizy do każdej z probówek. Delikatnie wirować i inkubować probówki przez 5 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
6. Dodać 1 ml wody dejonizowanej do każdej z probówek, delikatnie wymieszać i inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
7. Natychmiast pobrać zabarwioną próbkę na cytometr przepływowy. Jeśli zabarwiona próbka nie zostanie pobrana natychmiast, należy zamknąć probówkę, przechowywać w ciemności w temperaturze 2-8°C i poddać analizie w ciągu 2 godzin.

UWAGA: fluorescencja rodaminy 123, wytwarzana przez utlenianie DHR123, jest wykrywana w kanale FITC (525 nm). Ponieważ rodamina 123 jest szybko uwalniana z granulocytów, jak pokazano na rysunku 8, próbki należy **mierzyć tak szybko, jak to możliwe** (nie później niż 2 godziny po lizie), najlepiej w **ustandaryzowanym wąskim przedziale czasowym** (patrz strona 18).

UWAGA: wirować zabarwioną próbkę bezpośrednio przed akwizycją w cytometrze przepływowym, aby uniknąć tworzenia się agregatów.

Analiza metodą cytometrii przepływowej

Cytometr przepływowy wybrany do pracy z urządzeniem FagoFlowEx Kit należy rutynowo kalibrować przy użyciu mikrokulek fluorescencyjnych, aby zapewnić stabilną czułość detektorów zgodnie z zaleceniami producenta cytometru.

W przypadku nieprawidłowej konserwacji cytometr przepływowy może dawać fałszywe wyniki.

Patrz specyfikacje cytometru producenta dotyczące laserów i detektorów fluorescencyjnych zgodnie z charakterystyką wzbudzenia i emisji fluorochromów w rozdziale 6. Wymagany osprzęt.

Ustawić napięcia na odpowiednich detektorach fluorescencyjnych przed analizą zabarwionej próbki. Napięcie na detektorze PMT powinno być ustawione na tyle wysoko, aby jak najmniej zdarzeń wybarwionych ujemnie zakłócało kanał 0 na osi fluorescencji. Również napięcie detektora PMT nie powinno przekraczać wartości,

przy których dodatkowo zdarzenia są dociskane do prawej osi.

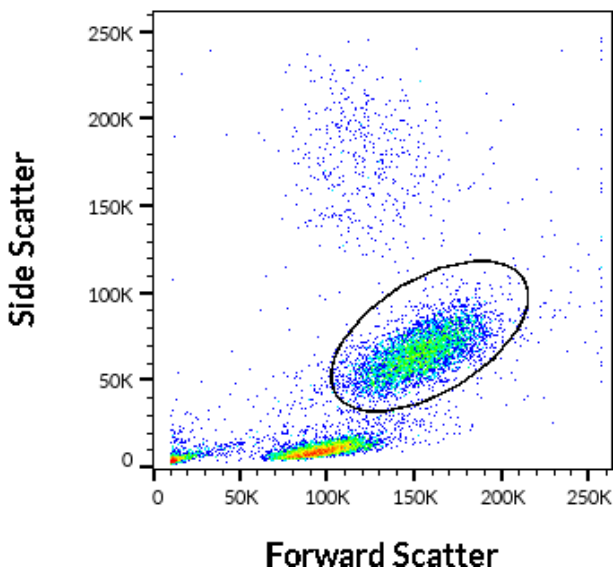
Do analizy danych pomiarowych można wykorzystać oprogramowanie cytometryczne opracowane przez producenta lub oprogramowanie dedykowane do analizy danych cytometrycznych offline (np. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analiza próbki pacjenta

Uzyskać co najmniej 5 000-10 000 zdarzeń leukocytów. Zwizualizować zarejestrowane zdarzenia na wykresie punktowym rozproszenia bocznego (SSC) i rozproszenia przedniego (FSC). Ustawić bramkę wokół granulocytów, jak pokazano na rysunku 1.

UWAGA: spożycie bakterii wpływa na pozycję granulocytów na wykresie punktowym SSC-FSC. W związku z tym należy dostosować bramkę indywidualnie do każdej reakcji.

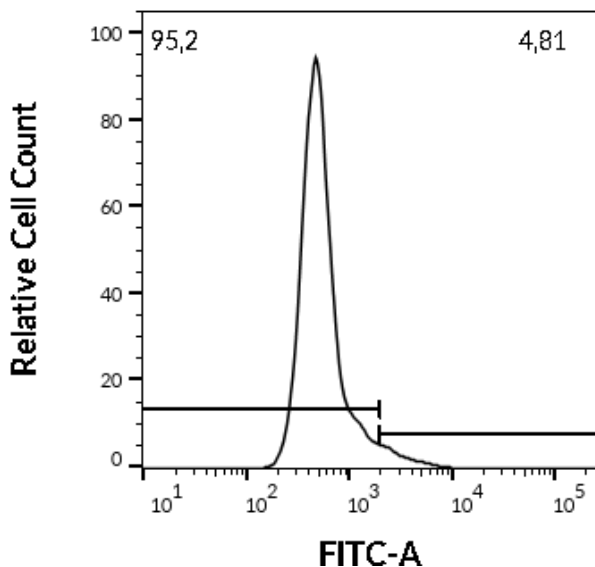
Rysunek 1 Określenie populacji granulocytów



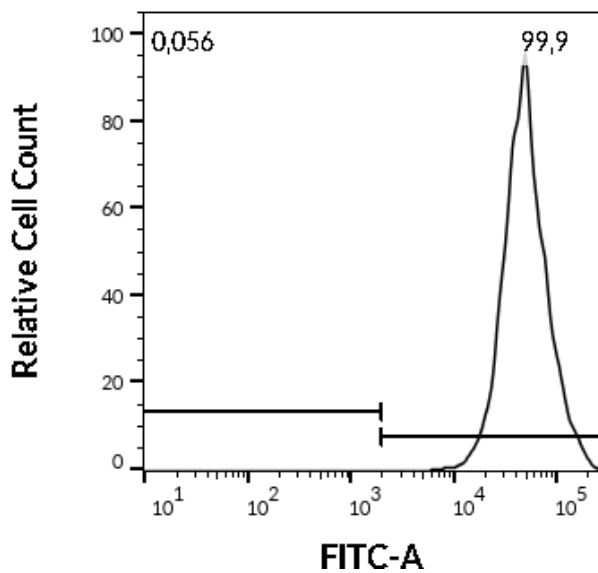
Zwizualizować bramkowane granulocyty jako histogramy, gdzie oś X przedstawia intensywność fluorescencji w kanale FITC. Użyć negatywnej kontroli reakcji, aby ustawić odpowiednią bramkę do rozróżnienia granulocytów dodatnich (komórki aktywnie fagocytujące wytwarzające RFT) i ujemnych (komórki nefagocytujące i niewytwarzające ROS). Skopiować bramkę do reakcji stymulacji E. coli i do pozytywnej kontroli reakcji (rys. 2a, 2b, 2c).

Granulocyty, które ulegają wybuchowi oksydacyjnemu, wykazują jasną fluorescencję rodaminy 123. Obliczyć średnią intensywność fluorescencji granulocytów dodatnich i ujemnych. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do wewnątrzkomórkowej aktywności enzymów wytwarzających ROS.

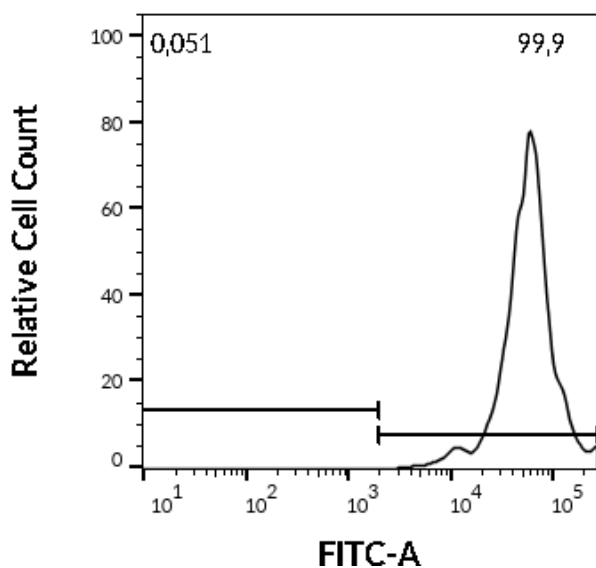
Rysunek 2a Histogram intensywności fluorescencji granulocytów z negatywnej kontroli reakcji



Rysunek 2b Histogram intensywności fluorescencji granulocytów z reakcji stymulowanej przez *E. coli*



Rysunek 2c Histogram intensywności fluorescencji granulocytów w pozytywnej kontroli reakcji



Obliczanie i interpretacja wyników analiz

Parametry ilościowe

Dwa parametry ilościowe są zgłaszane i interpretowane pod kątem tego, czy istnieją jakiegokolwiek oznaki defektu aktywności fagocytarnej lub defektu produkcji RFT:

a) **Względna liczba dodatnich granulocytów**, które wykazywały wybuch tlenowy po stymulacji *E. coli*.

b) **Wskaźnik stymulacji (SI)** obliczony jako stosunek średniej intensywności fluorescencji (MFI) dodatnich granulocytów reakcji stymulowanej przez *E. coli* i ujemnych granulocytów negatywnej kontroli reakcji.

Przykład obliczenia wskaźnika stymulacji

Tabela 2 Negatywna kontrola reakcji: MFI ujemnych i dodatnich granulocytów

Populacja	Liczba (%)	Średni FITC-A
negatywna	95,2	550
pozytywna	4,81	3995

Tabela 3 Reakcja stymulowana przez *E. coli*: MFI ujemnych i dodatnich granulocytów

Populacja	Liczba (%)	Średni FITC-A
negatywna	0,056	1224
pozytywna	99,9	53836

Stosunek wartości MFI granulocytów dodatnich z reakcji stymulowanej *E. coli* (w tabeli 3) podzielono przez wartość MFI granulocytów ujemnych z negatywnej kontroli reakcji (w tabeli 2).

$$\frac{\text{Wartość MFI dodatnich granulocytów z reakcji stymulowanej E.coli}}{\text{Wartość MFI granulocytów ujemnych z reakcji kontroli ujemnej}} =$$

$$\frac{53836}{550} = \text{SI (wskaźnik stymulacji)} = 98$$

Parametry jakościowe

Interpretacja danych jakościowych obejmuje nakładanie histogramów w celu oceny rozkładu sygnału i identyfikacji poszczególnych pików, które w przypadku występowania wielu populacji granulocytów należy analizować oddzielnie.

W przypadku **defektów wybuchu tlenowego** (brak utlenienia DHR123) otrzymane histogramy granulocytów pokażą zgodność rozkładu sygnału między reakcją stymulacji *E. coli* a pozytywną kontrolą reakcji (rys. 4, 5, 6).

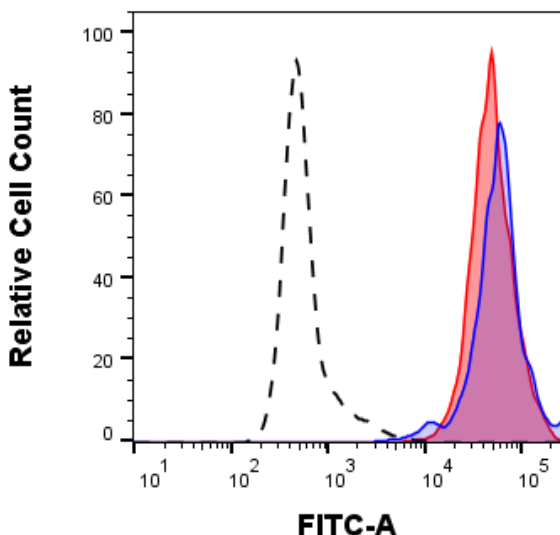
W przypadku **defektów aktywności fagocytarnej** (zmniejszone pochłanianie cząstek) otrzymane histogramy granulocytów pokażą rozbieżność rozkładu sygnału między reakcją stymulacji *E. coli* a pozytywną kontrolą reakcji. Reakcja stymulowana *E. coli* będzie miała populację granulocytów podzieloną na wiele pików o różnych intensywnościach fluorescencji, pozytywna kontrola reakcji będzie miała pojedynczy pik (rysunek 7).

UWAGA: wykrycie nietypowych wyników wskazuje jedynie na podejrzenie choroby, którą należy potwierdzić innymi badaniami.

Normalny wynik zdrowego dawcy

Granulocyty wykazują wysoki wybuch tlenowy po stymulacji **zarówno** *E. coli*, jak i pozytywną kontrolą reakcji (rysunek 3).

Rysunek 3 Nakładka histogramu: zdrowy dawca bez wady wybuchu tlenowego (SI = 98, względna liczba dodatnich granulocytów 99,9%). Dystrybucja sygnału granulocytów stymulowanych *E. coli* (wypełnionych na czerwono), granulocytów z negatywnej kontroli reakcji (czarne przerywane) i granulocytów z pozytywnej kontroli reakcji (wypełnione na niebiesko) w detektorze FITC.



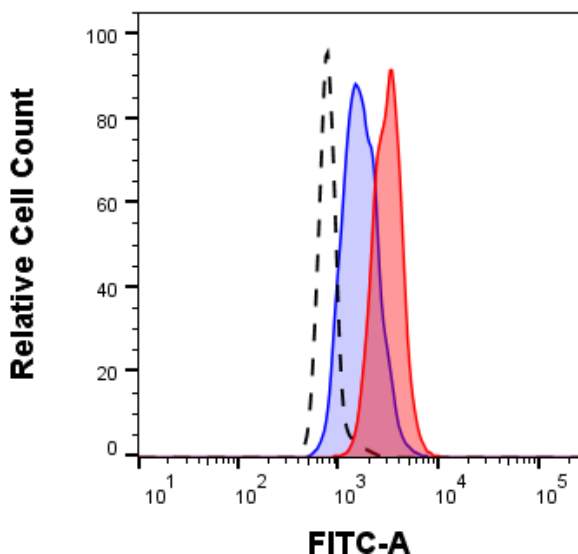
Wyniki wskazujące na defekt wybuchu tlenowego

1) Pojedynczy pik o niskim natężeniu sygnału

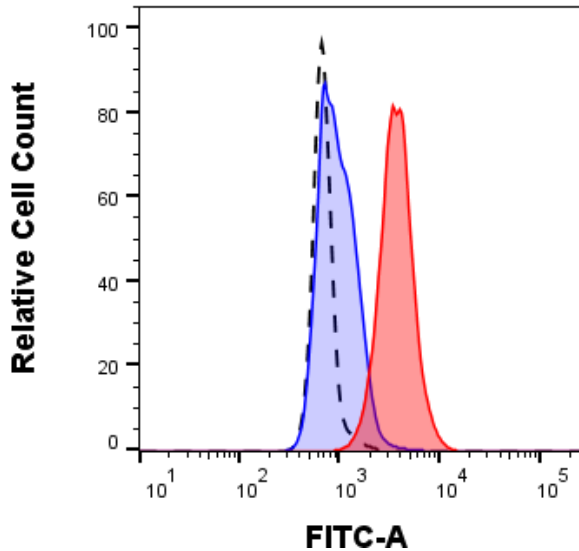
Jeśli granulocyty wykazują niski wybuch tlenowy po stymulacji **zarówno** *E. coli*, jak i pozytywną kontrolą reakcji wskazuje to na **niedobór mieloperoksydazy (MPO)** (rys. 4) lub rzadziej występującą **przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD)** (rys. 5). Intensywność wybuchu tlenowego w CGD zależy od mutacji w kompleksie enzymatycznym oksydazy NADPH. Istnieje pięć autosomalnych recesywnych typów (1-5) i jeden recesywny sprzężony z chromosomem X typ choroby.

UWAGA: test nie pozwala na rozróżnienie między niedoborem CGD i MPO.

Rysunek 4 Nakładka histogramu: pacjent z niedoborem MPO (SI = 11, względna liczba dodatnich granulocytów 89,7%). Dystrybucja sygnału granulocytów stymulowanych *E. coli* (wypełnionych na czerwono), granulocytów z negatywnej kontroli reakcji (czarne przerywane) i granulocytów z pozytywnej kontroli reakcji (wypełnione na niebiesko) w detektorze FITC.



Rysunek 5 Nałożony histogram: pacjent płci męskiej z chorobą CGD sprzężoną z chromosomem X, (SI = 16, względna liczba dodatnich granulocytów 99%). Dystrybucja sygnału granulocytów stymulowanych E. coli (wypełnionych na czerwono), granulocytów z negatywnej kontroli reakcji (czarne przerywane) i granulocytów z pozytywnej kontroli reakcji (wypełnione na niebiesko) w detektorze FITC.

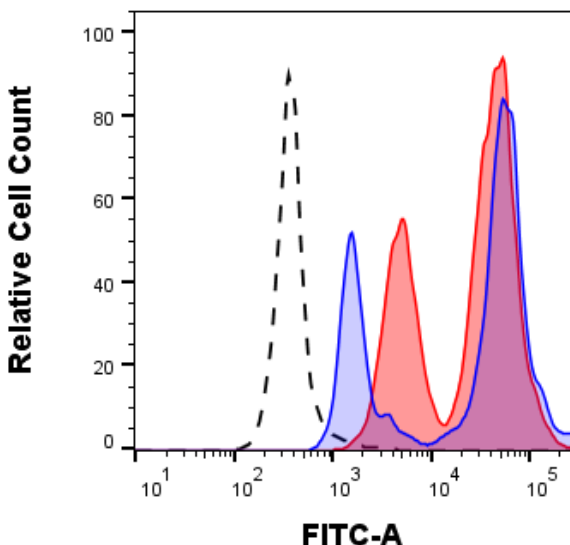


2) Dwa piki o różnym natężeniu sygnału

Jeżeli granulocyty pacjentki **wykazują dwie subpopulacje** różniące się intensywnością wybuchu tlenowego po stymulacji zarówno *E. coli*, jak i pozytywną kontrolą reakcji (ryc. 6), wskazuje to, że pacjentka cierpi na przewlekłą chorobę ziarniniakową sprzężoną z chromosomem-X.

UWAGA: trzy i więcej pików na histogramie wskazuje na zanieczyszczenie bramki populacji granulocytów w wykresie punktowym SSC vs. FSC (rysunek 1) monocytami lub martwymi komórkami niefagocytującymi.

Rysunek 6 Nakładka histogramu: kobieta z mutacją sprzężoną z chromosomem X genu oksydazy NADPH. Dwie subpopulacje granulocytów różnią się intensywnością wybuchu tlenowego (niski pik MFI SI = 14, względna liczba granulocytów 35%, wysoki pik MFI SI = 125, względna liczba granulocytów 65%). Dystrybucja sygnału granulocytów stymulowanych *E. coli* (wypełnionych na czerwono), granulocytów z negatywnej kontroli reakcji (czarne przerywane) i granulocytów z pozytywnej kontroli reakcji (wypełnione na niebiesko) w detektorze FITC.

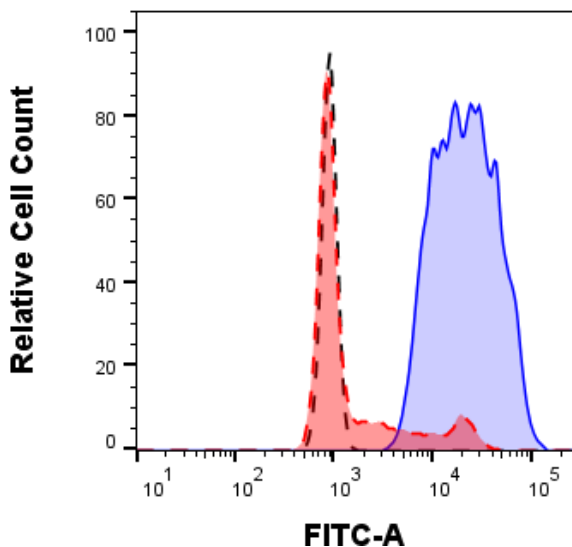


Wyniki wskazujące na defekt aktywności fagocytarnej

Różny wzór pików między pozytywną kontrolą reakcji a reakcją stymulowaną przez *E. coli*

Jeśli granulocyty stymulowane *E. coli* wykazują niski wybuch tlenowy, a granulocyty stymulowane kontrolą pozytywną wykazują wysoki wybuch tlenowy (rys. 7), wskazuje to na defekt aktywności fagocytarnej granulocytów, alternatywnie próbka krwi zawiera antykoagulant EDTA lub cytrynian lub próbka była stara lub niewłaściwie przechowywana.

Rysunek 7 Nakładka histogramu: próbka antykoagulowana EDTA (niski pik MFI SI = 1, względna liczba granulocytów 73%, wysoki pik MFI SI = 25, względna liczba 9%).
Dystrybucja sygnału granulocytów stymulowanych *E. coli* (wypełnionych na czerwono), granulocytów z negatywnej kontroli reakcji (czarne przerywane) i granulocytów z pozytywnej kontroli reakcji (wypełnione na niebiesko) w detektorze FITC.



11. Wydajność analityczna

Precyzja (powtarzalność i odtwarzalność)

Odtwarzalność testu została określona na podstawie danych uzyskanych przez pięciu operatorów analizujących sześć próbek krwi zdrowych dawców tego samego dnia w tych samych warunkach doświadczalnych.

Obliczono następujące parametry:

a) Do określenia względnej liczby dodatnich granulocytów

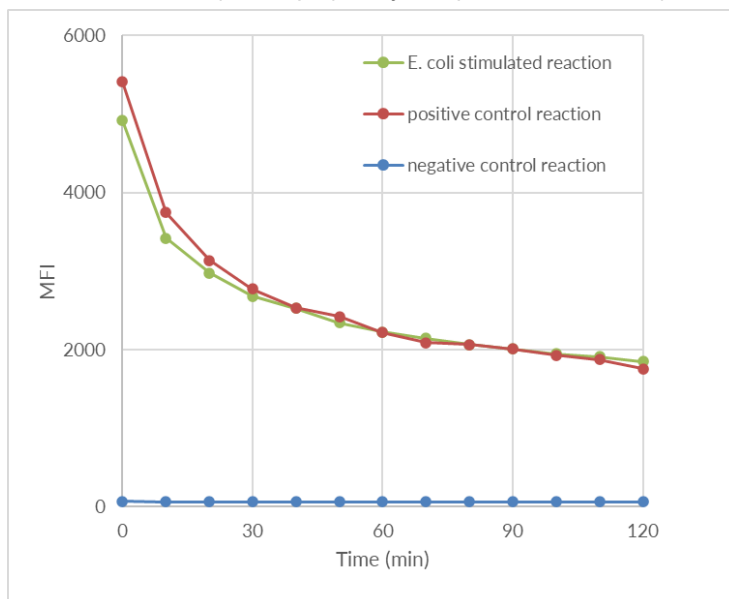
CV = 2%

b) Do określenia wskaźnika stymulacji

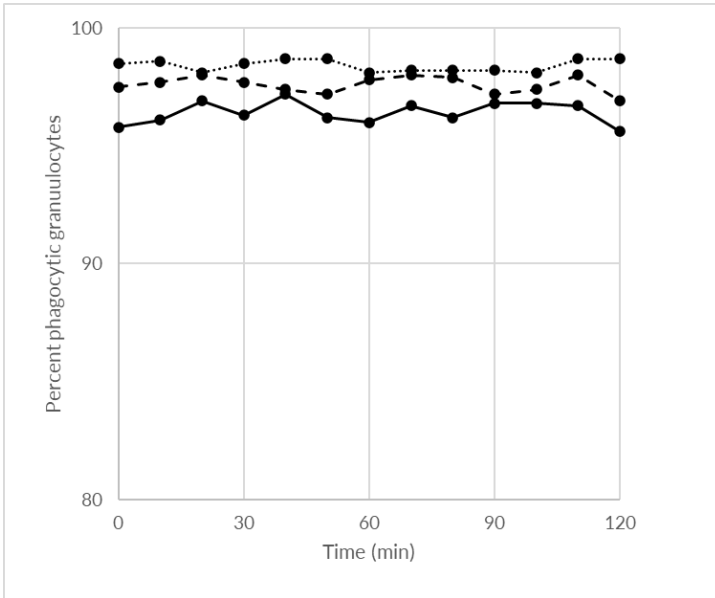
CV = 11%

Powtarzalność testu nie została określona. Ze względu na dynamikę zmian MFI związanych z uwalnianiem R123 z komórek (rys. 8, 9, 10), wartości powtarzalności będą zależały od czasu, jaki upłynął od zakończenia obróbki próbki (utrwalanie/liza RBC) do analizy FACS. Zaleca się wykonywanie analiz małych serii próbek i analizowanie ich w ustandaryzowanym wąskim oknie czasowym. Alternatywnie, większe serie można analizować później, np. po większej przerwie czasowej (40 minut), aby zminimalizować zmienność MFI.

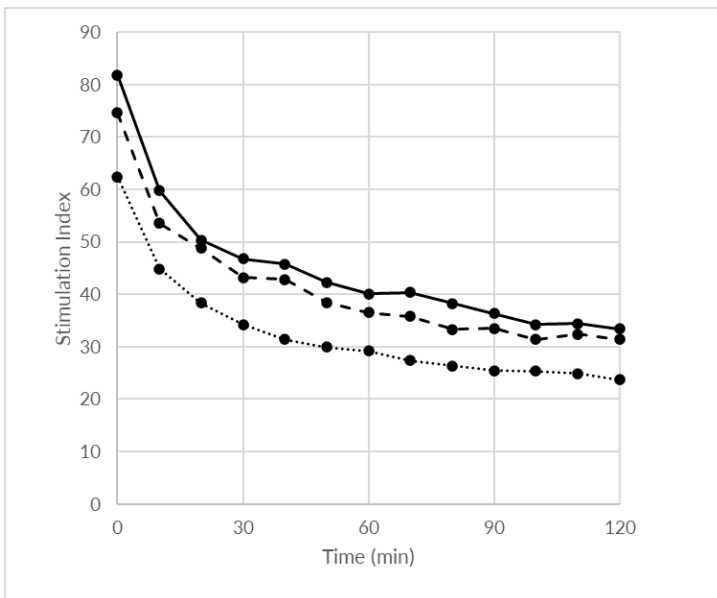
Rysunek 8 Rozwój średniej intensywności fluorescencji granulocytów (MFI) w czasie po lizie krwinek czerwonych, na przykład jedna próbka krwi (zdrowy dawca).



Rysunek 9 Aktywność fagocytarna granulocytów (%) rozwój w czasie po lizie krwinek czerwonych, 3 różne próbki krwi (zdrowi dawcy).



Rysunek 10 Rozwój wskaźnika stymulacji w czasie po lizie krwinek czerwonych, 3 różne próbki krwi (zdrowi dawcy).



12. Wydajność kliniczna

Test oceniano przez pomiary porównawcze z PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) przy użyciu próbek od łącznie 47 pacjentów (tabela 4). Oba zestawy wykryły: a) niepowodzenie przyjmowania cząstek (niska aktywność fagocytarna) oraz b) zaburzenia wybuchu oksydacyjnego (niedobór MPO, CGD) ze 100% czułością i 100% swoistością.

Tabela 4 Charakterystyka pacjenta w badaniu oceniającym wydajność

Charakterystyka pacjenta	n
Zdrowy dawca (niespokrewnione zaburzenie immunologiczne)	40
CGD (2 chorych i jeden nosiciel CGD)	3
Niedobór MPO	2
Niska aktywność fagocytarna (model choroby – antykoagulant EDTA)	2
Stare próbki (powtarzane pomiary zdrowych dawców w ciągu 48 godzin)	4

13. Oczekiwane wartości

Normalny zakres aktywności wybuchu tlenowego granulocytów określono w 40 próbkach krwi obwodowej zdrowych osób dorosłych.

- Granulocyty o aktywności wybuchu oddechowego
90–100%
- Indeks stymulacji granulocytów > 30
3^{ci} percentyl = 31
Mediana = 56
97^{my} percentyl = 97

Ponieważ wskaźnik stymulacji może różnić się w różnych laboratoriach i aparatach, każde laboratorium MUSI ustalić normalny zakres przy użyciu własnych warunków testowych na próbkach pochodzących od lokalnej populacji zdrowych dawców.

14. Substancje zakłócające i ograniczenia

Antykoagulanty EDTA i cytryniany negatywnie wpływają na wyniki analizy.

15. Bibliografia

- 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. Znaki towarowe

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ i FlowJo™ są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Becton, Dickinson and Company, Sysmex™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Sysmex Corporation, VenturiOne® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Cytognos S.L.

17. Historia zmian

Wersja 8, ED7042_IFU_v8

Zmieniono układ IFU.

18. Producent

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Republika Czeska

Dane kontaktowe

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

19. Upoważnieni przedstawiciele

N/A

UWAGA: każdy poważny incydent, który miał miejsce w związku z urządzeniem, należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi lokalnemu.