FagoFlowEx Kit

100 testů | Kat. č. **ED7042**

IVD CE

Návod k použití (CS)

Verze: ED7042_IFU_v8_CS

Datum vydání: 14-04-2023

Symboly použité k označení prostředku

IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*		Omezení teploty
CE	Označení shody CE		Chránit před slunečním zářením
	Výrobce		Chránit před vlhkem
UDI	Jedinečná identifikace prostředku (UDI)	CONTENTS	Obsah
	Čtěte návod k použití	UK CA	Označení shody UKCA
	Obsah postačuje pro <n> testů		
REF	Katalogové číslo		
LOT	Kód dávky		
	Použít do data		

1. Určený účel prostředku

FagoFlowEx Kit je určen pro stanovení fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů měřením respiračního (oxidačního) vzplanutí z plné krve pomocí průtokové cytometrie.

Co se zjišťuje a/nebo měří

Prostředek detekuje a měří dva parametry pomocí fluorogenního substrátu Dihydrorhodamin 123:

- procento neutrofilních granulocytů, které produkují reaktivní metabolity kyslíku (ROS) v reakci na pohlcení bakterií *E. coli*
- intracelulární aktivitu enzymů zodpovědných za produkci ROS.

Funkce prostředku

Prostředek je určen pro screening/pomoc při stanovení diagnózy vrozené nebo získané imunodeficience.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Neschopnost neutrofilních granulocytů katalyzovat produkci reaktivních forem kyslíku způsobuje Chronickou granulomatózní chorobu (CGD), skupinu dědičných poruch se společným fenotypovým projevem, závažnými opakujícími se bakteriálními a mykotickými infekcemi s tvorbou granulomů ve tkáních [1, 2, 3, 4]. Výsledky, které odpovídají CGD mohou mít příčinu také v deficitu MPO, který je nejčastější poruchou fagocytů, obvykle s projevy normálního fenotypu bez častějšího výskytu infekcí [5].

Pokles fagocytární aktivity bez poruchy enzymů produkujících ROS provází různé jiné klinické stavy spojené s oslabením imunity, buď primární variabilní imunitní nedostatečnost a deficit plazmatických opsoninů, nebo sekundární imunitní nedostatečnost [6, 7].

Typ testu

Není automatizovaný

Kvantitativní

Typ požadovaného vzorku

Vzorek lidské antikoagulované periferní plné krve

Testovací populace

Pacient s podezřením na poruchu funkce granulocytů

2. Účel použití

Prostředek je určen pouze pro profesionální použití v laboratoři. Prostředek není určen pro vyšetření v blízkosti pacienta nebo přímo u pacienta a není určen pro sebetestování.

Požadavky na kvalifikaci

Uživatel musí mít současné odborné znalosti v oblasti průtokové cytometrie, ovládat standardní laboratorní techniky, včetně pipetování, manipulovat bezpečně a správně se vzorky z lidského těla.

Uživatel musí splňovat normu EN ISO 15189, případně jiné národní legislativní normy.

3. Princip testu

Test je založen na měření produkce ROS v neutrofilních granulocytech pomocí fluorogenního substrátu Dihydrorhodaminu 123 (DHR123).

Během testu je vzorek lidské krve smíchán s tepelně inaktivovanými bakteriemi *E. coli* a s DHR123. Pohlcení *E. coli* neutrofilními granulocyty se podpoří zahřátím reakční směsi na 37 °C. Během inkubace jsou bakterie aktivně pohlcovány buňkami a pasivně po svém koncentračním gradientu do intracelulárního prostoru vstupuje nefluorescenční DHR123. Bakterie zůstanou zachycené uvnitř buněčných fagozomů a spustí enzymatické reakce, které vedou k produkci ROS. Ionty ROS oxidují DHR123 na fluorescenční rhodamin 123 (R123), který je excitován laserovým paprskem z průtokového cytometru během akvizice krevního vzorku. Následná emise světla z R123, která je přímo úměrná intracelulární aktivitě enzymů produkujících ROS, je zachycovaná a analyzovaná průtokovým cytometrem.

Paralelně se stimulací *E. coli* se provádějí další dvě reakce, negativní kontrolní reakce, která je reakcí bez *E. coli*, a pozitivní kontrolní reakce, která bez fagocytózy aktivuje enzymy k produkci ROS pomocí forbol 12-myristát 13-acetátu.

Buňky jsou považovány za aktivně fagocytující, pokud jejich fluorescence převyšuje fluorescenci buněk z reakce negativní kontroly. Výsledek je uváděn v procentech fagocytujících buněk. Intenzita fluorescence fagocytujících buněk je přímo úměrná intracelulární aktivitě enzymů produkujících ROS.

4. Poskytované materiály

Obsah

Prostředek FagoFlowEx Kit vystačí na provedení 100 testů a je dodáván ve formátu:

E. coli (5 lahviček) obsahující lyofilizované bakterie *E. coli*, 1 lahvička dostačuje pro stimulaci 20 vzorků krve (ED7042-1).

DHR123 (5 lahviček) obsahující lyofilizovaný Dihydrorhodamin 123, 1 lahvička dostačuje pro obarvení 60 vzorků krve (ED7042-2).

Stimulation Control (5 lahviček) obsahující lyofilizovaný PMA (forbol 12-myristát 13-acetát), 1 lahvička je určena pro 20 pozitivních kontrolních testů (ED7042-3).

Lysing Solution (1 láhev) obsahující 15 ml roztoku připraveného k použití

(ED7042-4).

5. Nutné, ale neposkytované materiály

Testovací zkumavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

6. Nutná zařízení

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (10 – 1000 µl) pro pipetování vzorků a činidel

Vortex

Termostatický inkubátor nebo vodní lázeň umožňující inkubovat testovací zkumavky při 37 °C

Průtokový cytometr vybavený laserovým excitačním zdrojem (488 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů z fluorochromů uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v prostředku

Fluorochrom	Excitace [nm]	Emise [nm]
Rhodamin 123	488	525

POZNÁMKA: Prostředek byl testován na průtokových cytometrech BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) a Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

Nezamrazujte.

Informace o stabilitě po prvním otevření a době použitelnosti po prvním otevření, spolu s podmínkami skladování a stabilitou pracovních roztoků (v případě potřeby) naleznete v části 10 Postup (Příprava reagencií).

8. Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VÝSTRAHA: Lysing Solution (ED7042-4) obsahuje formaldehyd (č. 50-00-0) a metanol (č. 67-56-1) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Nebezpečí
H-věty	H302 Zdraví škodlivý při požití. H315 Dráždí kůži. H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci. H319 Způsobuje vážné podráždění očí. H335 Může způsobit podráždění dýchacích cest. H341 Podezření na genetické poškození. H350 Může vyvolat rakovinu.
P-věty	P201 Před použitím si obstarejte speciální instrukce. P264 Po manipulaci důkladně omyjte ruce a zasažené části těla. P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle. P301+P312 PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte lékaře. P302+P352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. P305+P351+P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. P308+P313 PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P333+P313 Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P362+P364 Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Úplné informace o rizicích, která představují chemické látky a směsi obsažené v tomto výrobku a o tom, jak s nimi zacházet a jak je likvidovat, naleznete v Bezpečnostním listu (SDS), který je k dispozici na www.exbio.cz.

Biologické riziko
Lidské biologické vzorky, krevní vzorky a jakékoliv materiály, které s nimi přicházejí do kontaktu, jsou vždy považovány za infekční.

Používejte osobní ochranné a bezpečnostní pomůcky, abyste zabránili kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.

Dodržujte všechny platné zákony, předpisy a postupy pro manipulaci a likvidaci infekčních materiálů.

Projevy znehodnocení prostředku
Normální vzhled dodaných lyofilizovaných reagencií je bílý prášek (E. coli a Stimulační kontrola) nebo bílá pevná hmota (DHR123). Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. změnu barvy nebo skupenství (zkapalnění).

Normální vzhled lyzačního roztoku je čirá kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Omezení použití
Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

9. Vzorek

Použijte žilní periferní krev odebranou do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem heparin.

POZNÁMKA: Antikoagulancia EDTA a citrát negativně ovlivňují výsledky testu.

Vzorek krve v odběrové zkumavce musí být skladován při pokojové teplotě. Neuchovávejte v chladničce.

Vzorek krve zpracujte nejpozději do 24 hodin po odběru.

10. Postup

Příprava reagencií

E. coli

Rekonstituujte obsah lahvičky s *E. coli* ve 250 µl deionizované vody. Připravujte čerstvě každý den měření, skladujte při 2-8 °C a spotřebujte do 8 hodin. Případně lze reagencii zmrazit na -20 °C až -80 °C a použít do 7 dnů.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se opakovaného zmrazování a rozmrazování.

DHR123

Rekonstituujte obsah lahvičky DHR123 v 650 µl deionizované vody. Připravujte čerstvě každý den měření, skladujte při 2-8 °C a spotřebujte do 8 hodin. Případně lze reagencii zmrazit na -20 °C až -80 °C a použít do 7 dnů.

POZNÁMKA: Reagencie vydrží až 5 cyklů zmrazení a rozmrazení.

Stimulation control

Rekonstituujte obsah lahvičky Stimulation control ve 250 µl deionizované vody. Připravujte čerstvě každý den měření, skladujte při 2-8 °C a spotřebujte do 8 hodin. Případně lze reagencii zmrazit na -20 °C až -80 °C a použít do 7 dnů.

POZNÁMKA: Reagencie vydrží až 5 cyklů zmrazení a rozmrazení.

Lysing Solution

Reagencie je připravena k použití.

POZNÁMKA: Před použitím vytemperujte reagencii na pokojovou teplotu.

Značení vzorku

1. Pro vyšetření jednoho pacienta označte tři zkumavky s kulatým dnem 12 x 75 mm příslušnou identifikací vzorku a označením

   E. coli stimulovaná reakce,

   pozitivní kontrolní reakce (stimulace PMA)

   a negativní kontrolní reakce.

   Pipetujte na dno zkumavek

   - 10 µl E. coli do zkumavky označené jako E. coli stimulovaná reakce.
   - 10 µl Stimulation Control do zkumavky označené jako pozitivní kontrolní reakce.
   - Do zkumavky označené jako negativní kontrolní reakce nepipetujte nic.

2. Pipetujte 50 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno každé ze zkumavek a jemně vortexujte.

   UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud stopy nebo kapky krve ulpí na stěně zkumavky, nemusí být obarveny reagencií nebo nemusí dojít k lýzi erytrocytů a výsledek testu nemusí být platný.

3. Přidejte 10 µl DHR123 na dno každé ze zkumavek a jemně vortexujte.

4. Umístěte zkumavky do 37 °C na 20 min do vodní lázně nebo na 30 minut do termostatického inkubátoru.

5. Přidejte 50 µl lyzačního roztoku do každé ze zkumavek. Jemně vortexujte a inkubujte zkumavky po dobu 5 minut při pokojové teplotě ve tmě.

6. Přidejte 1 ml deionizované vody do každé ze zkumavek, jemně vortexujte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě ve tmě.

7. Obarvený vzorek ihned měřte průtokovým cytometrem. V případě, že obarvený vzorek nebude okamžitě změřen, uchovávejte v temnu při 2-8 °C a analyzujte do 2 hodin.

   UPOZORNĚNÍ: Fluorescence Rhodaminu 123, vzniklého oxidací DHR123, je detekována v kanálu FITC (525 nm). Rhodamin 123 se z granulocytů rychle uvolňuje, jak je ukázáno na obrázku 8, proto je třeba **změřit vzorky co nejdříve** (nejpozději 2 hodiny od lyze), nejlépe **ve standardizovaném úzkém časovém okně** (viz strana 18).

   UPOZORNĚNÍ: Bezprostředně před akvizicí průtokovým cytometrem vzorek vortexujte, aby se zabránilo tvorbě agregátů.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s prostředkem FagoFlowEx Kit musí být rutinně kalibrován pomocí fluorescenčních mikrokuliček podle pokynů výrobce cytometru, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

Při nesprávné údržbě může průtokový cytometr poskytovat falešné výsledky.

V sekci 6 Nutná zařízení jsou uvedeny potřebné specifikace cytometru pro lasery a fluorescenční detektory podle excitačních a emisních charakteristik fluorochromů.

Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.

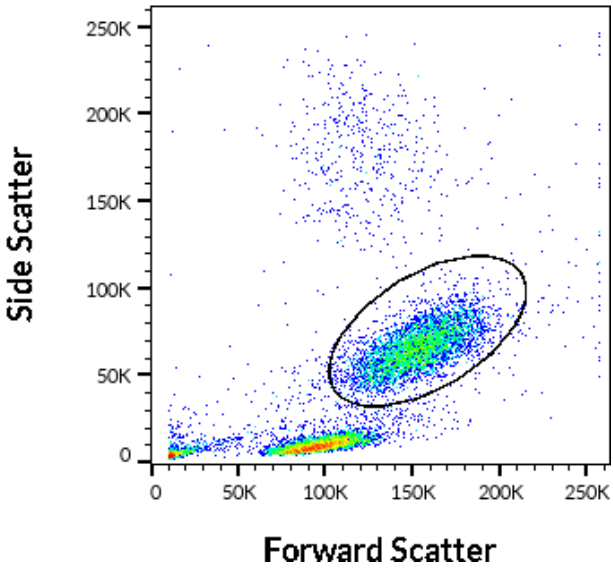
Pro analýzu naměřených dat je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analýza pacientského vzorku

Změřte minimálně 5 000-10 000 leukocytů. Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward scatter (FSC). Ohraničte populaci granulocytů, jak je znázorněno na obrázku 1.

UPOZORNĚNÍ: Pozice granulocytů se v grafu SSC-FSC kvůli pohlcení bakterií mění, proto upravte nastavení ohraničujícího regionu individuálně pro každou reakci.

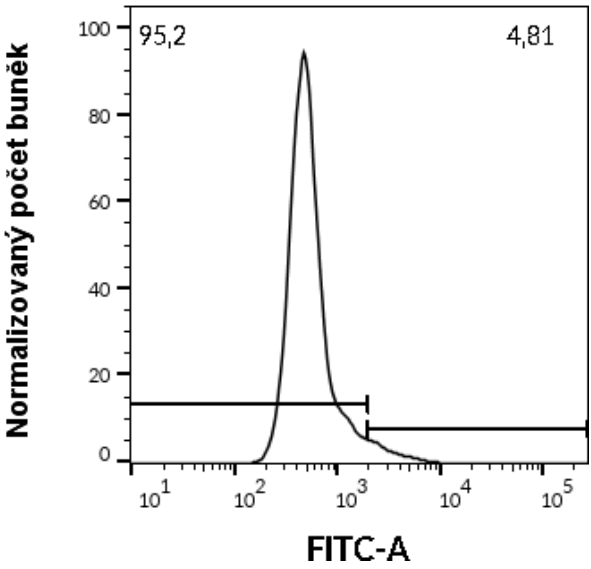
Obrázek 1 Ohraničení populace granulocytů



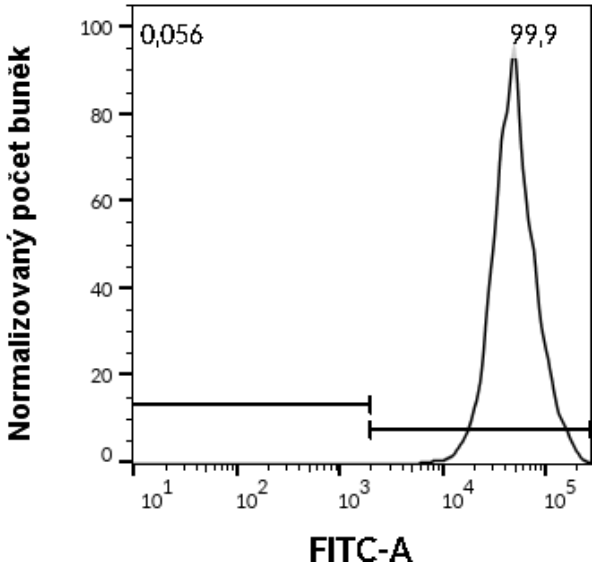
Zobrazte ohraničené granulocyty jako histogram, kde na ose X bude vynesena intenzita fluorescence v kanálu pro FITC. Použijte negativní kontrolní reakci pro nastavení hranice rozdělující pozitivní (aktivně fagocytující buňky produkující ROS) a negativní (nefagocytující buňky neprodukující ROS) granulocyty. Zkopírujte rozdělení hranice do histogramů z *E. coli* stimulované reakce a do histogramu z pozitivní kontrolní reakce (obrázek 2a, 2b, 2c).

Granulocyty, u kterých proběhlo oxidační vzplanutí, budou vykazovat jasnou fluorescenci Rhodaminu 123. Vypočítejte střední hodnotu intenzity fluorescence pozitivních a negativních granulocytů. Intenzita fluorescence je přímo úměrná intracelulární aktivitě enzymů produkujících ROS.

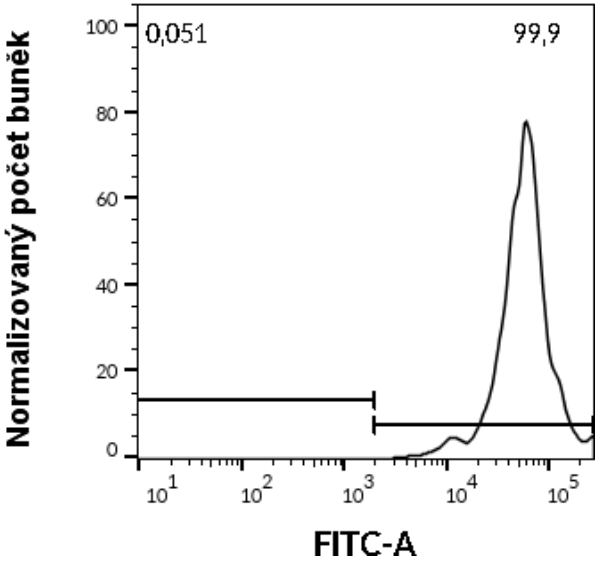
Obrázek 2a Histogram intenzity fluorescence granulocytů z negativní kontrolní reakce



Obrázek 2b Histogram intenzity fluorescence granulocytů z E. coli stimulované reakce



Obrázek 2c Histogram intenzity fluorescence granulocytů z pozitivní kontrolní reakce



Výpočet a interpretace analytických výsledků

Kvantitativní parametry

Výsledkem testu jsou dva kvantitativní parametry, které jsou interpretovány s ohledem na to, zda byl detekován defekt ve fagocytární aktivitě nebo defekt v produkci ROS:

a) Relativní počet pozitivních granulocytů, které vykazovaly respirační vzplanutí po stimulaci E. coli.

b) Stimulační index (SI) vypočítaný jako poměr střední hodnoty fluorescence (MFI) pozitivních granulocytů z reakce stimulované *E. coli* a negativních granulocytů z negativní kontrolní reakce.

Příklad výpočtu Stimulačního Indexu

Tabulka 2 Negativní kontrolní reakce: MFI negativních a pozitivních granulocytů

Populace	Počet (%)	Průměr FITC-A
negativní	95,2	550
pozitivní	4,81	3995

Tabulka 3 *E. coli* stimulovaná reakce: MFI negativních a pozitivních granulocytů

Populace	Počet (%)	Průměr FITC-A
negativní	0,056	1224
pozitivní	99,9	53836

Střední hodnota intenzity fluorescence pozitivních granulocytů z reakce stimulované E. coli (v tabulce 3) podělte střední hodnotou intenzity fluorescence negativních granulocytů z negativní kontrolní reakce (v tabulce 2).

$$\frac{\text{MFI pozitivních granulocytů z reakce stimulované E.coli}}{\text{MFI negativních granulocytů z negativní kontrolní reakce}} =$$

$$\frac{53836}{550} = \text{SI (Stimulační Index)} = 98$$

Kvalitativní parametry

Kvalitativní interpretace dat zahrnuje přeložení vícero histogramů přes sebe s cílem hodnotit distribuci signálu a identifikovat jednotlivé vrcholy rozdělení, které v případě výskytu vícero granulocytárních populací je nutné analyzovat samostatně.

V případě **defektu respiračního vzplanutí** (nedostatek oxidace DHR123) budou výsledné histogramy granulocytů vykazovat shodu distribuce signálu mezi reakcí stimulovanou E. coli a pozitivní kontrolní reakcí (obrázek 4, 5, 6).

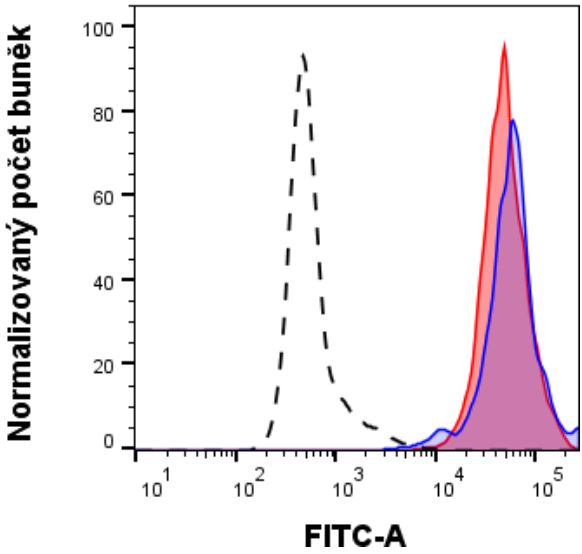
V případě **defektů fagocytární aktivity** (snížené pohlcování částic) budou výsledné histogramy granulocytů ukazovat nesrovnalosti v distribuci signálu mezi reakcí stimulovanou E. coli a pozitivní kontrolní reakcí. Reakce stimulovaná *E. coli* bude mít populaci granulocytů rozdělenou do více vrcholů s různou intenzitou fluorescence a pozitivní kontrolní reakce bude ukazovat jednovrcholové rozdělení (obrázek 7).

> **UPOZORNĚNÍ:** Detekce abnormálních výsledků naznačuje pouze podezření na onemocnění, které je třeba potvrdit dalšími testy.

Normální výsledek zdravého dárce

Granulocyty vykazují vysokou úroveň respiračního vzplanutí v reakci stimulované E. coli i v pozitivní kontrolní reakci (obrázek 3).

Obrázek 3 Překryv histogramů: Zdravý dárce bez defektu respiračního vzplanutí (SI = 98, relativní počet pozitivních granulocytů 99,9 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).



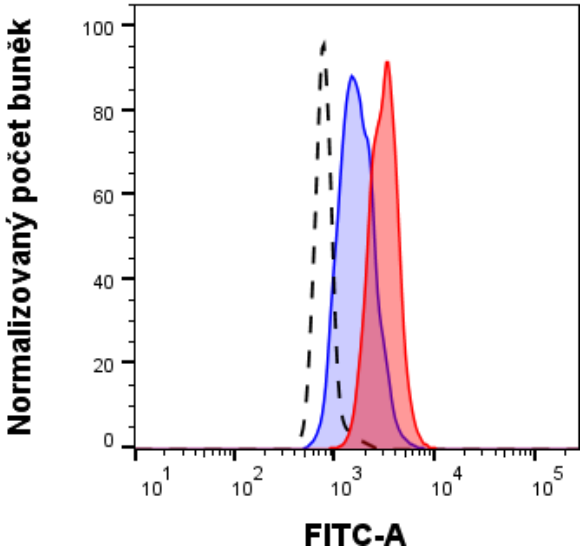
Výsledky ukazující na defekt respiračního vzplanutí

1) Jednovrcholové rozdělení s nízkou intenzitou signálu

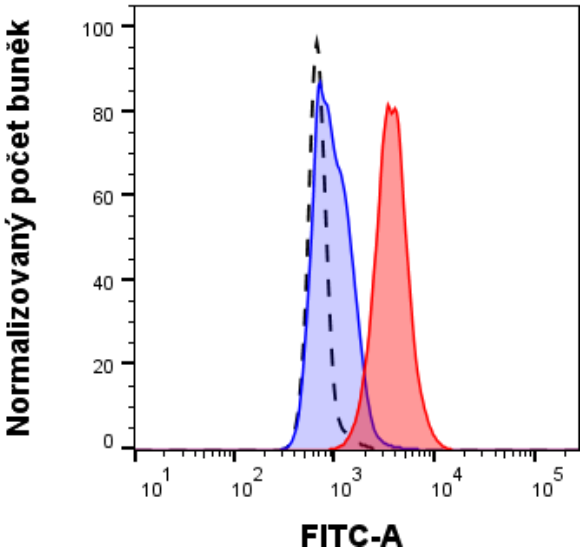
Pokud granulocyty vykazují nízkou úroveň respiračního vzplanutí po E. coli stimulaci i v pozitivní kontrolní reakci, ukazuje to buď na **deficit myeloperoxidázy (MPO) (**obrázek 4), nebo méně často na **chronickou granulomatózní chorobu (CGD)** (obrázek 5). Intenzita respiračního vzplanutí u CGD závisí na mutaci enzymového komplexu NADPH oxidázy. Existuje pět autozomálně recesivních typů (1-5) a jeden X-vázaný recesivní typ tohoto onemocnění.

UPOZORNĚNÍ: Test nedokáže rozlišit deficit mezi CGD a MPO.

Obrázek 4 Překryv histogramů: Pacient s deficitem MPO, (SI = 11, relativní počet pozitivních granulocytů 89,7 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).



Obrázek 5 Překryv histogramů: Pacient muž s X-vázanou formou CGD, (SI = 16, relativní počet pozitivních granulocytů 99 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).

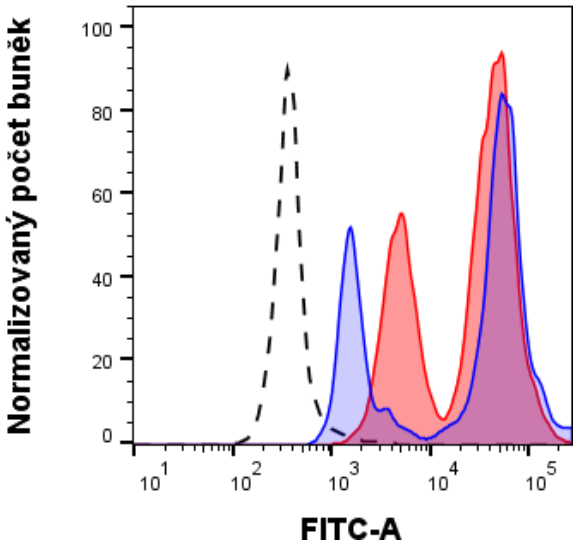


2) Dvouvrcholové rozdělení s různou intenzitou signálu

Pokud v reakci stimulované E. coli i v pozitivní kontrolní reakci vykazují granulocyty od pacientky **dvě subpopulace** s odlišnou intenzitou respiračního vzplanutí (obrázek 6), znamená to, že pacientka je přenašečkou X vázané formy CGD.

> **UPOZORNĚNÍ:** Tři a více vrcholů v histogramu poukazují na kontaminaci populace granulocytů při ohraničení v grafu SSC vs. FSC (obrázek 1) jinou subpopulací (monocyty) nebo mrtvými nefagocytujícími buňkami.

Obrázek 6 Překryv histogramů: Žena nesoucí mutaci na chromozomu X v genu NADPH oxidázy. Dvě subpopulace granulocytů se liší intenzitou respiračního vzplanutí (nízký vrchol MFI SI = 14, relativní počet granulocytů 35 %, vysoký vrchol MFI SI = 125, relativní počet granulocytů 65 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).

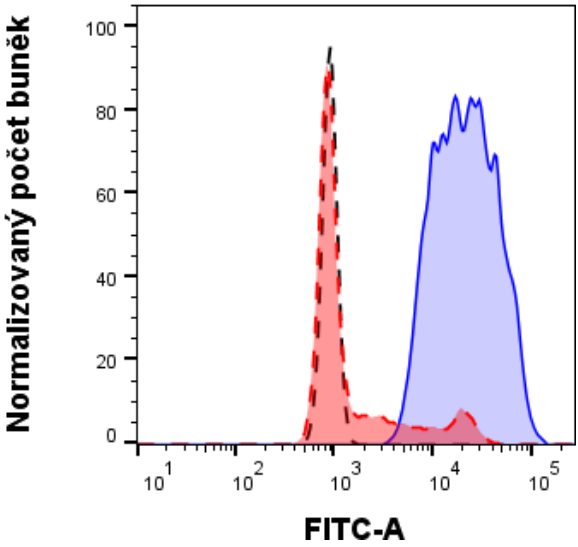


Výsledky ukazující na poruchu fagocytární aktivity

Odlišné distribuční rozdělení mezi reakcí stimulovanou E. coli a pozitivní kontrolní reakcí

Pokud granulocyty stimulované E. coli vykazují nízkou úroveň respiračního vzplanutí a granulocyty stimulované v pozitivní kontrolní reakcí vykazují vysokou úroveň respiračního vzplanutí (obrázek 7), ukazuje to na poruchu fagocytární aktivity granulocytů, případně, že se jedná o vzorek krve, který obsahuje antikoagulant EDTA nebo citrát anebo vzorek starý nebo nesprávně skladovaný.

Obrázek 7 Překryv histogramů: Vzorek antikoagulovaný EDTA, (nízký MFI vrchol SI = 1, relativní počet granulocytů 73 %, vysoký MFI vrchol SI = 25, relativní počet 9 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované E. coli (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).



11. Vlastnosti analytické funkce

Přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost)

Reprodukovatelnost testu byla stanovena z dat získaných pěti operátory analyzujícími šest krevních vzorků zdravých dárců krve ve stejný den za stejných experimentálních podmínek.

Z dat byly vypočteny následující parametry:

a) Pro stanovení relativního počtu pozitivních granulocytů

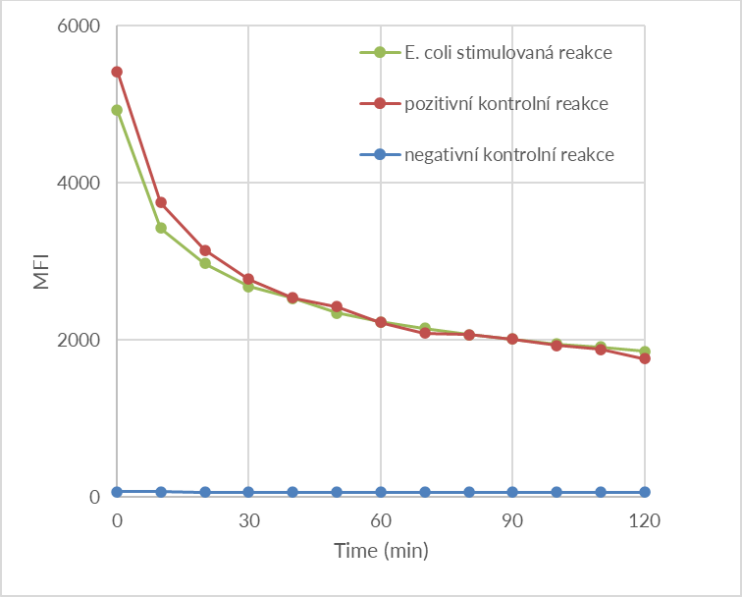
CV = 2 %

b) Pro stanovení stimulačního indexu

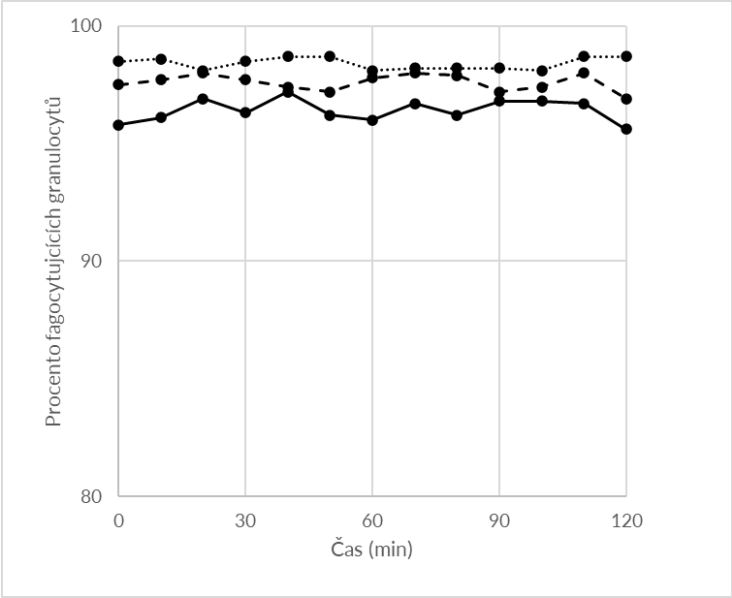
CV = 11 %

Opakovatelnost testu nebyla provedena. Vzhledem k dynamice změn v MFI spojených s uvolňováním R123 z buněk (obrázek 8, 9, 10) by hodnoty opakovatelnosti byly ovlivněny dobou, která uplynula mezi ukončením zpracování vzorku (fixace/lyze červených krvinek) a jeho analýzou pomocí cytometru. Doporučujeme provádět analýzu vzorků v malých sériích a měřit je ve standardizovaném úzkém časovém okně. Případně analyzovat větší série vzorků s časovým odstupem, např. po delší časové prodlevě (40 minut), která minimalizuje variabilitu v MFI.

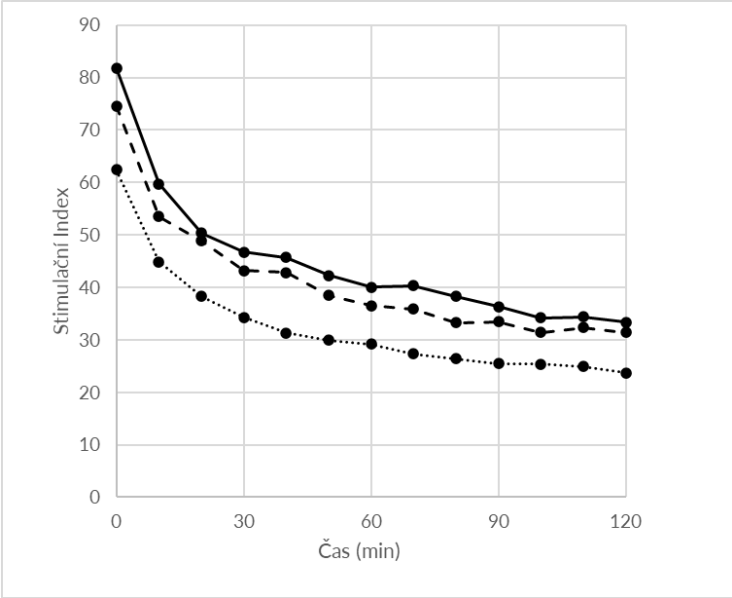
Obrázek 8 Střední hodnota intenzity fluorescence granulocytů v čase po lyzy červených krvinek, ukázán jeden vzorek krve jako příklad (zdravý dárce).



Obrázek 9 Fagocytární aktivita granulocytů (%) v čase po lyzy červených krvinek, 3 různé krevní vzorky (zdraví dárci).



Obrázek 10 Stimulační Index v čase po lyzy červených krvinek, 3 různé krevní vzorky (zdraví dárci).



12. Vlastnosti klinické funkce

Prostředek byl hodnocen srovnávacím měřením s testem PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) s použitím vzorků od celkem 47 pacientů (tabulka 4). Oba kity byly schopny detekovat: a) selhání ingesce částic (nízká fagocytární aktivita) i b) poruchy oxidativního vzplanutí (deficit MPO, CGD) se 100% citlivostí a 100% specificitou.

Tabulka 4 Charakteristika souboru pacientů ve studii funkční způsobilosti

Popis pacientského vzorku	n
Zdravý dárce (nesouvisející imunologická porucha)	40
CGD (2 nemocní a jedna přenašečka)	3
MPO deficit	2
Nízká fagocytární aktivita (model onemocnění - EDTA antikoagulant)	2
Staré vzorky (opakovaná měření zdravých dárců za 48 hodin)	4

13. Očekávané hodnoty

Referenční intervaly pro respirační vzplanutí granulocytů byly stanoveny na 40 vzorcích periferní krve zdravých dárců.

- Počet granulocytů s respiračním vzplanutím

  90–100 %

- Stimulační index granulocytů > 30

  3. percentil = 31

  Medián = 56

  97. percentil = 97

Protože se stimulační index může v různých laboratořích a na různých přístrojích lišit, MUSÍ si každá laboratoř ustanovit vlastní rozmezí normálních hodnot pomocí vlastních testovacích podmínek na vzorcích od místní populace zdravých dárců.

14. Rušivé látky a omezení

Antikoagulancia EDTA a citrát negativně ovlivňují výsledky testu.

15. Odkazy

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. Ochranné známky

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ a FlowJo™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson and Company, Sysmex™ je registrovaná ochranná známka firmy Sysmex Corporation, VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L..

17. Historie revizí

Verze 8, ED7042_IFU_v8
Uspořádání návodu k použití bylo změněno.

18. Výrobce

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

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

19. Zplnomocněný zástupce

N/A

POZNÁMKA: Jakákoli vážná událost, která se vyskytla v souvislosti s prostředkem, musí být oznámena výrobci a místnímu příslušnému úřadu.