

exbio

Komplekt FagoFlowEx

100 testi | kataloogi number ED7042



Kasutusjuhend (ET)

Versioon: ED7042_IFU_v8_ET

Väljaandmise kuupäev 14.04.2023

Seadme märgistuses kasutatavad sümbolid

	Meditsiiniline in vitro diagnostikavahend		Temperatuuri piirväärtused
	CE-vastavusmärgis		Hoida päikesevalgusest eemal
	Tootja		Hoida kuivana Hoida vihma eest kaitstult
	Seadme ainulaadne identifikaator		Sisu
	Vaadake kasutusjuhendit		UKCA mark
	Sisaldab piisavalt <n> teste		
	Katalooginumber		
	Partiikood		
	Kõlblik kuni		

1. Sihtotstarve

FagoFlowEx Kit on ette nähtud neutrofiilsete granulotsüütide fagotsüütilise aktiivsuse määramiseks, mõõtes respiratoorse (oksüdatiivse) purske taset täisveres voolutsütomeetria abil.

Mida tuvastatakse ja/või mõõdetakse

Seade tuvastab ja mõõdab kahte parameetrit, kasutades fluorogeenset substraati divesinikrodamiini 123:

- reaktiivseid hapnikuliike (ROS) tootvate neutrofiilsete granulotsüütide osakaal vastuseks *E. coli* bakterite kapseldamisele
- ROSi tootvate ensüümide rakusisene aktiivsus.

Seadme funktsioon

Seade on ette nähtud kaasasündinud või omandatud immuunpuudulikkuse sõeluuringuks/diagnoosimiseks.

Füsioloogilise või patoloogilise seisundi kontekst

Neutrofiilsete granulotsüütide võimetus katalüüsida reaktiivsete hapnikuliikide tootmist põhjustab kroonilist granulomatoosset haigust (CGD), mis on pärilike haiguste rühm, mille ühiseks fenotüübiks on korduvad tõsised bakteriaalsed ja seeninfektsioonid ning koegranuloomide moodustumine.^(1, 2, 3, 4) CGD-le vastavad tulemused võivad tuleneda ka MPO puudulikkusest, mis on kõige levinum fagotsüütide defekt ning esineb tavaliselt normaalse fenotüübina ilma infektsioonide suurenenud esinemissageduseta.⁽⁵⁾

Fagotsüütilise aktiivsuse vähenemine ilma ROSi tootvate ensüümide defektita esineb mitmesuguste teiste kliiniliste seisundite puhul, mis on seotud immunosupressiooniga primaarse muutuva immuunpuudulikkuse ja plasma opsoniini puudulikkusega või sekundaarse immuunpuudulikkusega.^(6, 7)

Analüüsi tüüp

Ei ole automatiseeritud

Kvantitatiivne

Vajaliku proovi tüüp

Inimese hepariiniga antikoaguleeritud täisveri

Analüüsi populatsioon

Patsient, kellel kahtlustatakse granulotsüütide funktsiooni kahjustust

2. Kavandatud kasutaja

Seade on ette nähtud ainult professionaalseks laboratoorseks kasutamiseks. Ei ole mõeldud patsiendilähedaseks testimiseks või enesetestimiseks.

Kvalifikatsiooninõuded

Kavandatud kasutajal peavad olema ajakohased teadmised inimrakkude voolutsütomeetrisest analüüsist, standardsetest laborimeetoditest, sealhulgas pipettimisoskus, inimkehast saadud proovide ohutu ja nõuetekohase käitlemise oskus.

Kavandatud kasutaja peab vastama standardile EN ISO 15189 või vajaduse korral muudele siseriiklikele sätetele.

3. Katse põhimõte

Katse põhineb ROSi tootmise mõõtmisel neutrofiilsetes granulotsüütides fluoregeense substraadi divesinikrodamiini 123 (DHR123) abil.

Katse käigus inkubeeritakse inimvere proovi kuumuses inaktiveeritud *E. coli* bakterite ja DHR123-ga. Reaktsioonisegu viiakse temperatuurini 37 °C, et soodustada *E. coli* fagotsütoosi neutrofiilsete granulotsüütide poolt. Inkubatsiooni ajal neelavad bakterid aktiivselt rakke, samal ajal kui mittefluorestseeruv DHR123 tungib passiivselt rakusisesesse keskkonda oma kontsentratsioonigradiendi kaudu. Bakterid satuvad rakkude fagosoomidesse ja initsieerivad ensümaatilisi reaktsioone, mille tulemuseks on ROSi tootmine. ROSi ioonid oksüdeerivad DHR123 fluorestseeruvaks rodamiin 123-ks (R123), mida voolutsütomeetri laserikiir ergutab vereproovi võtmise ajal. Edasi kogutakse ja analüüsitakse voolutsütomeetriga R123 valguskiirgust, mis vastab ROSi tootvate ensüümide rakusisesele aktiivsusele.

Paralleelselt *E. coli* stimulatsiooniga viiakse läbi veel kaks reaktsiooni: negatiivne kontrollreaktsioon, mis on reaktsioon ilma *E. coli*'ta, ja positiivne kontrollreaktsioon, milles kasutatakse forbool-12-müristaat-13-atsetaati, mis aktiveerib ROSi tootvaid ensüüme ilma fagotsütoosita.

Rakud fagotsüteerivad aktiivselt, kui nende fluorestsentsi väärtus ületab negatiivse kontrollreaktsiooni rakkude fluorestsentsi väärtuse. Tulemus esitatakse fagotsüteerivate rakkude protsendina. Fagotsüteerivate rakkude fluorestsentsi intensiivsus on otseselt proportsionaalne ROSi tootvate ensüümide rakusisesest aktiivsusega.

4. Kaasas olevad reaktiivid

Sisu

Seade FagoFlowEx Kit, millest piisab 100 testiks, sisaldab järgmisi reaktiive:

E. coli (5 viaali), mis sisaldavad lüofiliseeritud *E. coli* baktereid, 1 vial on piisav 20 vereproovi stimuleerimiseks (ED7042-1).

DHR123 (5 viaali), mis sisaldab lüofiliseeritud divesinikrodamiini 123, ühest viaalist piisab 60 vereproovi värvimiseks (ED7042-2).

Stimulatsioonikontroll (5 viaali), mis sisaldab lüofiliseeritud PMA_d (forbool 12-müristaat-13-atsetaat), üks viaal on ette nähtud 20 positiivse kontrolli testimiseks (ED7042-3).

Lüüsimislahus (1 pudel), mis sisaldab 15 ml kasutusvalmis lahust (ED7042-4).

5. Vajaminevad materjalid, mida pole kaasas

Ümmarguse põhjaga testkatsutid (12 × 75 mm)

Deioniseeritud vesi (reaktiiviklass)

6. Vajaminevad seadmed

Automaatne pipett ühekordsete otsikutega (10–1000 µl) proovide ja reaktiivide pipettimiseks.

Keerissegur

Termostaat (õhkinkubaator) või vesivann, mis võimaldab inkubeerida katsuteid temperatuuril 37 °C

Voolutsütomeetri laseri ekstsitatsiooniallikas (488 nm), hajumiste detektorid, optilised filtrid ja emissioonidetektor, mis sobivad fluorokroomi signaali kogumiseks, on esitatud tabelis 1.

Tabel 1 Seadmes kasutatava fluorokroomi spektraalne iseloomustus

Fluorokroom	Ekstsitatsioon [nm]	Emissioon [nm]
Rodamiin 123	488	525

MÄRKUS. Seadet katsetati voolutsütomeetritega BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) ja Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Hoidmine ja käitlemine

Säilitage temperatuuril 2–8 °C.

Vältige pikaajalist kokkupuudet valgusega.



Ärge laske külmuda.

Vt jaotises 10 „Toimingud“ (reaktiivi valmistamine) teavet kasutusstabiilsuse ja kõlblikkusaja kohta pärast esimest avamist, samuti töölahuste säilitamistingimuste ja stabiilsuse kohta (kui see on asjakohane).

8. Hoiatused, ettevaatusabinõud ja kasutuspiirangud

GHSi ohuklassifikatsioon

HOIATUS. Lüüsimislahus (ED7042-4) sisaldab formaldehüüdi (CASi nr 50-00-0) ja metanooli (CASi nr 67-56-1) ohtlikuks klassifitseeritud kontsentratsioonis.

Mürgistuselemendid	Märksõna
	Oht
	
Ohulaused	H302 Allaneelamisel kahjulik. H315 Põhjustab nahaärritust. H317 Võib põhjustada allergilist nahareaktsiooni. H319 Põhjustab tugevat silmade ärritust. H335 Võib põhjustada hingamisteede ärritust. H341 Arvatavalt põhjustab geneetilisi defekte. H350 Võib põhjustada vähktõbe.
Ohutuslaused	P201 Enne kasutamist tutvuda erijuhistega. P264 Pärast käitlemist pesta hoolega käsi ja ainega kokkupuutunud kehaosi. P280 Kanda kaitsekindaid/kaitserõivastust/kaitseprille/kaitsemaski. P301 + P312 ALLANEELAMISE KORRAL: halva enesetunde korral võtta ühendust MÜRGISTUSTEABEKESKUSE või arstiga. P302 + P352 NAHALE SATTUMISE KORRAL: pesta rohke vee ja seebiga. P305 + P351 + P338 SILMA SATTUMISE KORRAL: loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldada kontaktläätsed, kui neid kasutatakse ja kui neid on kerge eemaldada. Loputada veel kord. P308 + P313 Kokkupuute või kokkupuutekahtluse korral: pöörduda arsti poole. P333 + P313 Nahaärrituse või lööbe korral: pöörduda arsti poole. P362 + P364 Võtta saastunud rõivad seljast ja pesta neid enne

	järgmist kasutamist.
--	----------------------

Tutvuge toote saidil www.exbio.cz ohutuskaardiga (SDS), et saada täielikku teavet tootes sisalduvate keemiliste ainete ja segude põhjustatud ohtude kohta ning nende käitlemise ja kõrvaldamise kohta.

Bioloogiline oht

Inimese bioloogilisi proove ja vereproove ning nendega kokkupuutuvaid materjale peetakse alati nakkusohtlikeks.

Kasutage isikukaitsevahendeid, et vältida kokkupuudet naha, silmade ja limaskestadega.

Järgige kõiki kohaldatavaid seadusi, määrusi ja menetlusi nakkusohtlike materjalide käitlemiseks ning kõrvaldamiseks.

Riknemise tunnused

Lüofiliseeritud reaktiivide tavaline välimus on valge pulber (*E. coli* ja stimulatsioonikontroll) või tahke lüofiliseeritud koogisarnane tükk (DHR123). Ärge kasutage reaktiivi, kui täheldate mingeid muutusi aine välimuses, näiteks värvimuutust või vedeldumist.

Lüüsimislahuse tavaline välimus on selge vedelik. Ärge kasutage reaktiivi, kui täheldate mingeid muutusi selle välimuses, näiteks hägusust või sademe tekkimist.

Kasutuspiirangud

Ärge kasutage pärast toote etiketil märgitud kõlblikkusaega.

9. Proov

Kasutage meditsiiniseadmena klassifitseeritud proovianumasse kogutud perifeerset veeniverd, milles on hepariini antikoagulant.

ETTEVAATUST! Antikoagulandid EDTA ja tsitraat mõjutavad analüüsitulemusi negatiivselt.

Vereproovi kogumisanumat tuleb hoida toatemperatuuril. Mitte külmutada.

Töödelge vereproov hiljemalt 24 tundi pärast vere kogumist.

10. Toimingud

Kaasas olevate reaktiivide valmistamine

E. coli

Lahustage *E. coli* viaali sisu 250 µl deioniseeritud vees. Valmistage igal mõõtmispäeval värskelt, säilitage temperatuuril 2-8 °C ja kasutage järgmise 8 tunni jooksul. Alternatiivselt võib reaktiivi külmutada temperatuuril -20 °C kuni -80 °C ja kasutada 7 päeva jooksul.

ETTEVAATUST! Vältige korduvaid külmutus-/sulatustsükleid.

DHR123

Lahustage DHR123 viaali sisu 650 µl deioniseeritud vees. Valmistage igal mõõtmispäeval värskelt, säilitage 2-8 °C juures ja kasutage järgmise 8 tunni jooksul. Alternatiivselt võib reaktiivi külmutada temperatuuril -20 °C kuni -80 °C ja kasutada 7 päeva jooksul.

MÄRKUS. Alikvooditud lahus peab vastu kuni 5 külmutamis-/sulatamistsüklit.

Stimulatsioonikontroll

Lahustage stimulatsioonikontrolli sisu 250 µl deioniseeritud vees. Valmistage igal mõõtmispäeval värskelt, säilitage 2-8 °C juures ja kasutage järgmise 8 tunni jooksul. Alternatiivselt võib reaktiivi külmutada temperatuuril -20 °C kuni -80 °C ja kasutada 7 päeva jooksul.

MÄRKUS. Alikvooditud lahus peab vastu kuni 5 külmutamis-/sulatamistsüklit.

Lüüsimislahus

Reaktiiv on kasutusvalmis.

MÄRKUS. Reaktiiv tuleb enne kasutamist viia toatemperatuurile.

Proovide värvimine

1. Ühe patsiendi uurimiseks märgistage kolm 12 × 75 mm suurust ümmarguse põhjaga testkatsutit asjakohase proovi ID ja märgistusega, et määrata

E. coli stimuleeritud reaktsioon,

positiivne kontrollreaktsioon (PMA stimulatsioon)

ja negatiivne kontrollreaktsioon.

Pipettige testkatsutite põhja

- 10 µl E. coli bakterit E. coli stimuleeritud reaktsioonina märgitud katsutisse.
 - 10 µl stimulatsioonikontrolli positiivse kontrollreaktsioonina märgitud katsutisse.
 - Ärge pipettige midagi negatiivse kontrollreaktsioonina märgitud katsutisse.
2. Pipettige 50 µl hästi segatud vereproovi iga katsuti põhja ja keerutage ettevaatlikult.

ETTEVAATUST! Vältige vere pipettimist katsuti küljele. Kui vereplekk või tilk jääb katsuti küljele, ei pruugi see olla reaktiiviga värvitud või erütrotsüüdid ei pruugi olla lüüsitud ja testitulemus ei pruugi olla kehtiv.

3. Pipettige 10 µl DHR123 iga katsuti põhja ja keerutage ettevaatlikult.
4. Asetage katsutid 20 minutiks veevanni temperatuuril 37 °C või 30 minutiks õhkinkubaatorisse.
5. Lisage igasse katsutisse 50 µl lüüsimislahust. Keerutage ettevaatlikult ja inkubeerige katsuteid 5 minutit toatemperatuuril pimedas.
6. Lisage igasse katsutisse 1 ml deioniseeritud vett, keerutage ettevaatlikult ja inkubeerige 10 minutit toatemperatuuril pimedas.
7. Võtke värvitud proov kohe voolutsütomeetrisse. Kui värvitud proovi ei võeta kohe, katke katsuti, hoidke seda pimedas 2–8 °C juures ja analüüsige 2 tunni jooksul.

ETTEVAATUST! DHR123 oksüdeerimisel tekkiva rodamiini 123 fluorestseerumine tuvastatakse FITC kanalil (525 nm). Kuna rodamiin 123 vabaneb granulotsüütidest kiiresti, nagu on näidatud joonisel 8, tuleb proovid **mõõta võimalikult kiiresti** (mitte hiljem kui 2 tundi pärast lüüsimist), eelistatavalt **standarditud kitsas ajaaknas** (vt lk 18).

ETTEVAATUST! Keerutage värvitud proovi vahetult enne voolutsütomeetritele võtmist, et vältida agregaatide tekkimist.

Voolutsütomeetriline analüüs

Seadmega FagoFlowEx Kit kasutamiseks valitud voolutsütomeeter kalibreeritakse rutiinselt fluorestseeruvaid mikrohelmeid kasutades, et tagada detektorite stabiilne tundlikkus tsütomeetri tootja juhiste järgi.

Kui voolutsütomeetrit ei hooldata nõuetekohaselt, võib see anda valesid tulemusi.

Vaadake tootja tsütomeetri spetsifikatsiooni laserite ja fluorestsentsdetektorite kohta fluorokroomide ekstsitatsiooni- ja emissiooniomaduste alusel jaotises 6 „Vajalikud seadmed“.

Enne värvitud proovi analüüsi määrake huvipakkuvate fluorestsentsdetektorite pinged. PMT detektori pinged peaks olema seatud piisavalt kõrgeks, et minimaalne hulk negatiivselt värvitud sündmusi segaks 0. kanalit fluorestsentsi teljel. Samuti ei tohiks PMT detektori pinged ületada väärtusi, mille puhul positiivsed sündmused surutakse paremale teljele.

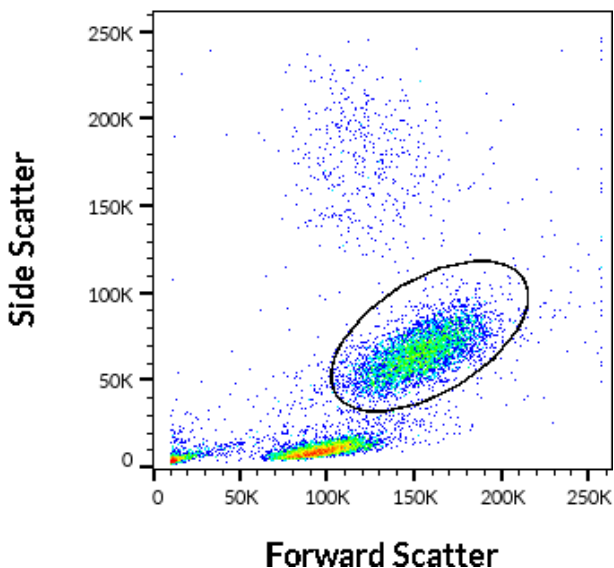
Mõõteandmete analüüsiks on võimalik kasutada tootja välja töötatud tsütomeetri tarkvara või tsütomeetriliste andmete analüüsiks ettenähtud tarkvara (näiteks FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Patsiendi proovi analüüs

Koguge vähemalt 5000–10 000 leukotsüütidega seotud juhtu. Visualiseerige kogutud juhud külghajumise (SSC) ja ettepoole hajumise (FSC) punktdiagrammil. Seadke ümber granulotsüütide piir, nagu on näidatud joonisel 1.

ETTEVAATUST! Bakterite kapseldamine mõjutab granulotsüütide paiknemist SSC-FSC punktdiagrammil. Selle tõttu reguleerige piir iga reaktsiooni jaoks eraldi.

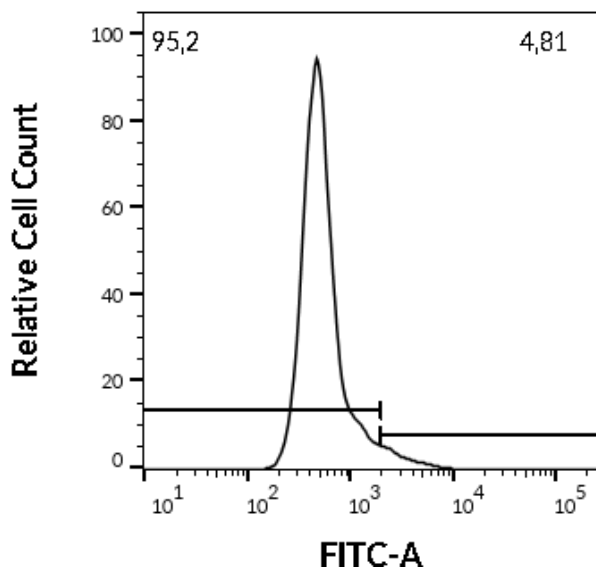
Joonis 1 Granulotsüütide populatsiooni piiritlemine



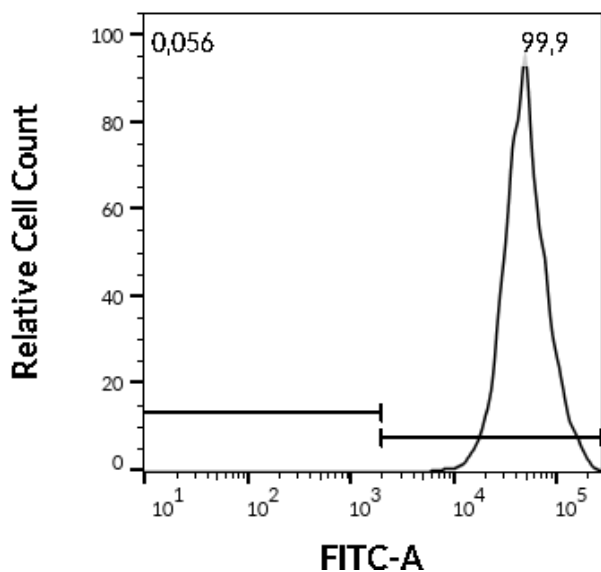
Visualiseerige granulotsüüdid histogrammidena, kus X-telg tähistab fluorestsentsi intensiivsust FITC kanalis. Kasutage negatiivset kontrollreaktsiooni, et määrata sobiv piir positiivsete (aktiivselt fagotsüteerivad ROSi tootvad rakud) ja negatiivsete (mittefagotsüteerivad ROSi mittetootvad rakud) granulotsüütide eristamiseks. Kopeerige piir *E. coli* stimulatsioonireaktsiooni ja positiivse kontrollreaktsiooni jaoks (joonis 2a, 2b, 2c).

Granulotsüüdid, mis läbivad oksüdatiivse purske, on erksa rodamiin 123 fluorestseerumisega. Arvutage positiivsete ja negatiivsete granulotsüütide keskmine fluorestsentsi intensiivsus. Fluorestsentsi intensiivsus on otseselt proportsionaalne ROSi tootvate ensüümide rakusisese aktiivsusega.

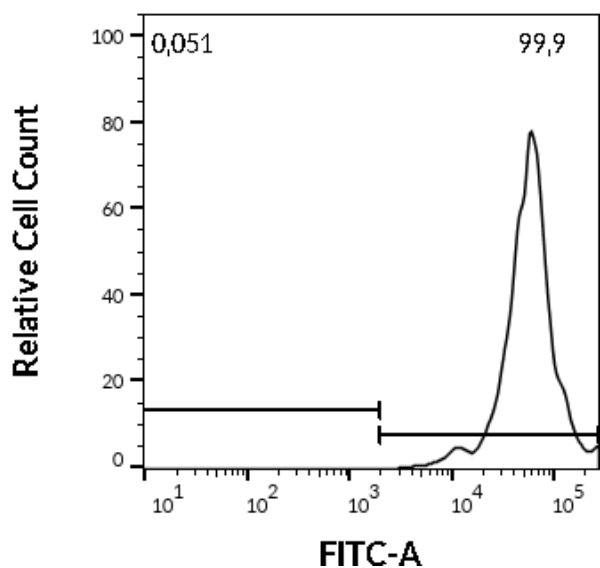
Joonis 2a Granulotsüütide fluorestsentsi intensiivsuse histogramm negatiivse kontrollreaktsiooni puhul



Joonis 2b Granulotsüütide fluorestsentsi intensiivsuse histogramm E. coli stimuleeritud reaktsioonist



Joonis 2c Granulotsüütide fluorestsentsi intensiivsuse histogramm positiivses kontrollreaktsioonis



Analüüsitulemuste arvutamine ja tõlgendamine

Kvantitatiivsed parameetrid

Esitatakse kaks kvantitatiivset parameetrit, mida tõlgendatakse selles osas, kas on märke fagotsüütilise aktiivsuse või ROSi tootmise defektist:

a) **Positiivsete granulotsüütide suhteline arv**, mis näitas pärast *E. coli*'ga stimuleerimist respiratoorset purset.

b) **Stimulatsiooniindeks (SI)**, mis on arvutatud *E. coli* stimuleeritud reaktsiooni positiivsete granulotsüütide ja negatiivse kontrollreaktsiooni negatiivsete granulotsüütide keskmise fluorestsentsi intensiivsuse (MFI) suhtena.

Stimulatsiooniindeksi arvutamise näide

Tabel 2 Negatiivne kontrollreaktsioon: Negatiivsete ja positiivsete granulotsüütide MFI

Populatsioon	Arv (%)	Keskmine FITC-A
negatiivne	95,2	550
positiivne	4,81	3995

Tabel 3 *E. coli* stimuleeritud reaktsioon: negatiivsete ja positiivsete granulotsüütide MFI

Populatsioon	Arv (%)	Keskmine FITC-A
negatiivne	0,056	1224
positiivne	99,9	53 836

E. coli stimuleeritud reaktsiooni positiivsete granulotsüütide MFI väärtus (tabelis 3) jagatakse negatiivse kontrollreaktsiooni negatiivsete granulotsüütide MFI väärtusega (tabelis 2).

MFI *E. coli* poolt stimuleeritud reaktsioonist saadud positiivsete granulotsüütide väärtus

_____ =
MFI negatiivsete granulotsüütide väärtus negatiivsest kontrollreaktsioonist

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

Kvalitatiivsed parameetrid

Kvalitatiivne andmete tõlgendamine hõlmab histogrammide kattumist, et hinnata signaali jaotumist ja tuvastada üksikud piigid, mida mitme granulotsüütide populatsiooni esinemise korral tuleb eraldi analüüsida.

Hingamispurse defektide korral (DHR123 oksüdatsiooni puudumine) näitavad saadud granulotsüütide histogrammid signaali jaotuse vastavust *E. coli* stimulatsioonireaktsiooni ja positiivse kontrollreaktsiooni vahel (joonised 4, 5, 6).

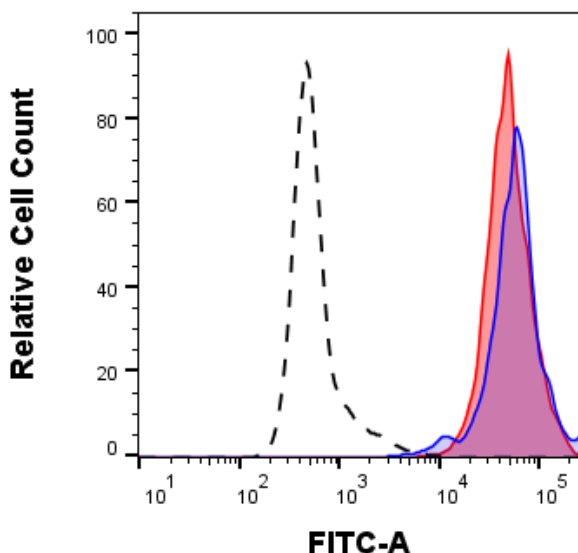
Fagotsüütilise aktiivsuse defektide korral (vähenenud osakeste neelamine) näitavad saadud granulotsüütide histogrammid signaali jaotuse erinevust *E. coli* stimulatsioonireaktsiooni ja positiivse kontrollreaktsiooni vahel. *E. coli* stimuleeritud reaktsioonis jaguneb granulotsüütide populatsioon mitmeks erineva fluorestsentsi intensiivsusega piigiks, positiivse kontrolli reaktsioonis on üks piik (joonis 7).

MÄRKUS. Ebatavaliste tulemuste avastamine viitab ainult haiguse kahtlusele, mida tuleb kinnitada teiste testidega.

Terve doonori normaalne tulemus

Granulotsüütidel on suur respiratoorne purse pärast stimuleerimist nii *E. coli* kui ka positiivse kontrollreaktsiooniga (joonis 3).

Joonis 3 Histogrammi ülekate: Terve doonor ilma hingamispurse defektita (SI = 98, positiivne granulotsüütide suhteline arv 99,9%). *E. coli* stimuleeritud granulotsüütide (punase värviga), negatiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (mustalt kriipsuga) ja positiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (sinise värviga) signaali jaotus FITC detektoris.



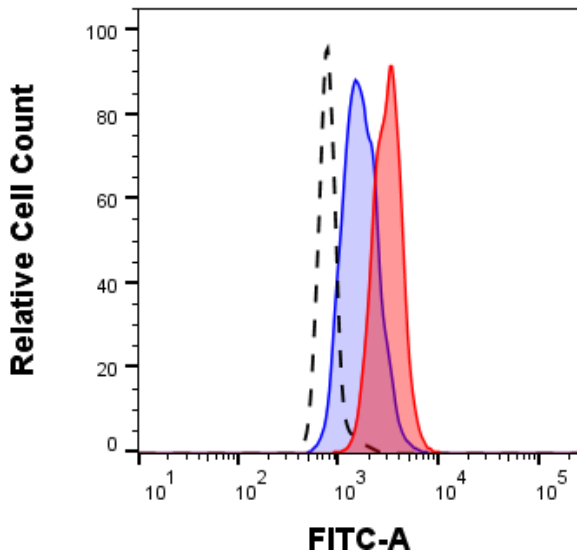
Tulemused, mis viitavad hingamisteede defektile

1) Üksik piik signaali väikese intensiivsusega

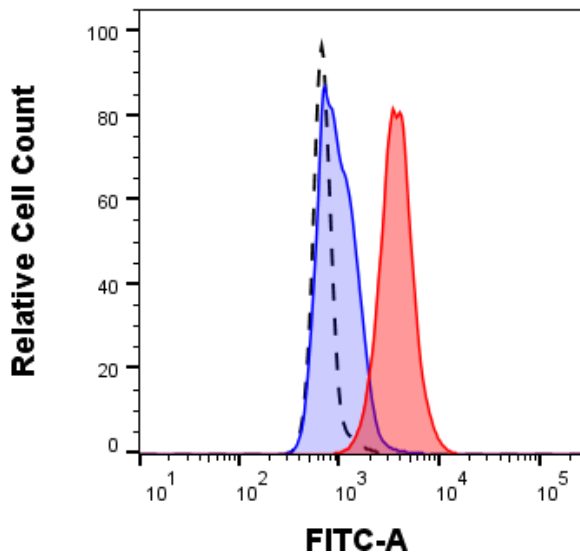
Kui granulotsüütidel on pärast *E. coli* ja positiivse kontrollreaktsiooniga stimuleerimist väike respiratoorne purse, viitab see **müeloperoksidaasi (MPO) puudulikkusele** (joonis 4) või vähem levinud **kroonilisele granulomatoosile (CGD)** (joonis 5). CGD puhul sõltub respiratoorse purske intensiivsus NADPH oksüdaasi ensüümikompleksi mutatsioonist. On olemas viis autosomaalselt retsessiivset tüüpi (1–5) ja üks X-liiteline retsessiivne tüüp.

ETTEVAATUST! Test ei võimalda eristada CGD ja MPO puudulikkust.

Joonis 4 Histogrammi ülekate: MPO puudulikkusega patsient (SI = 11, positiivne granulotsüütide suhteline arv 89,7%). *E. coli* stimuleeritud granulotsüütide (punase värviga), negatiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (musta kriipsuga) ja positiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (sinise värviga) signaalijaotus FITC detektoris.



Joonis 5 Histogrammi ülekate: Meespatsient, kellel on X-liitega CGD (SI = 16, positiivne granulotsütide suhteline arv 99 %). E. coli stimuleeritud granulotsütide (punase värviga), negatiivse kontrollreaktsiooni granulotsütide (musta kriipsuga) ja positiivse kontrollreaktsiooni granulotsütide (sinise värviga) signaalijaotus FITC detektoris.

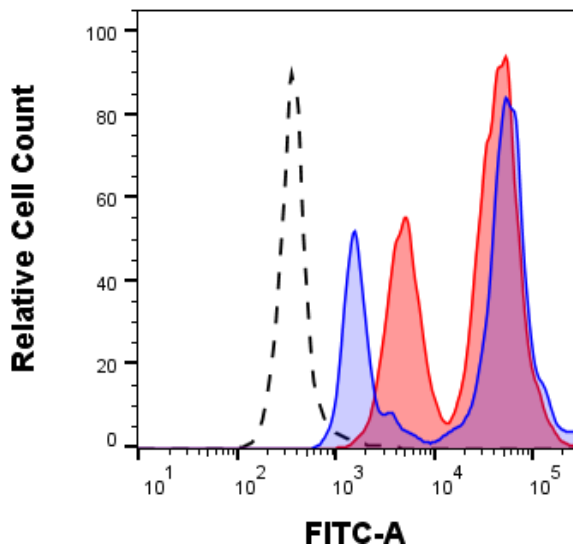


2) Kaks erineva signaali intensiivsusega piiki

Kui naispatsiendi granulotsüütidel on kaks alampopulatsiooni, mis erinevad respiratoorse purske intensiivsuse poolest pärast stimulatsiooni nii *E. coli* kui ka positiivse kontrollreaktsiooniga (joonis 6), näitab see, et patsient on X-liitega CGD kandja.

ETTEVAATUST! Kolm ja enam piiki histogrammis näitavad granulotsüütide populatsiooni piiri saastumist SSC vs. FSC punktdiagrammil (joonis 1) monotsüütidega või surnud mittefagotsüteerivate rakkudega.

Joonis 6 Histogrammi ülekate: NADPH oksüdaasi geeni X-liitelise mutatsiooniga naine. Kaks granulotsüütide alampopulatsiooni erinevad respiratoorse purske intensiivsuse poolest (madal MFI piik SI = 14, granulotsüütide suhteline arv 35%, kõrge MFI piik SI = 125, granulotsüütide suhteline arv 65%). *E. coli* stimuleeritud granulotsüütide (punase värviga), negatiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (musta kriipsuga) ja positiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (sinise värviga) signaalijaotus FITC detektoris.

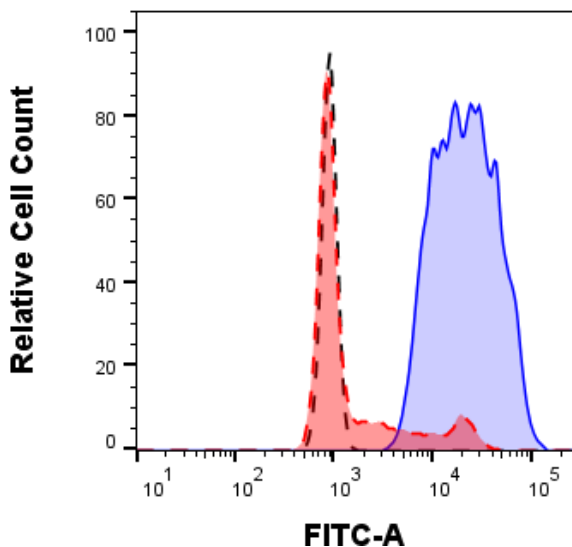


Fagotsüütilise aktiivsuse defekti näitavad tulemused

Positiivse kontrollreaktsiooni ja *E. coli* stimuleeritud reaktsiooni erinev piikide muster.

Kui *E. coli*'ga stimuleeritud granulotsüüdid näitavad väikest respiratoorset purset ja positiivse kontrollreaktsiooniga stimuleeritud granulotsüüdid suurt respiratoorset purset (joonis 7), näitab see granulotsüütide fagotsüütilise aktiivsuse defekti, alternatiivselt sisaldab vereproov antikoagulanti EDTA või tsitraati või proov oli vana või valesti säilitatud.

Joonis 7 Histogrammi ülekate: EDTAga antikoaguleeritud proov (madal MFI piik SI = 1, granulotsüütide suhteline arv 73%, kõrge MFI piik SI = 25, suhteline arv 9%). *E. coli* stimuleeritud granulotsüütide (punase värviga), negatiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (musta kriipsuga) ja positiivse kontrollreaktsiooni granulotsüütide (sinise värviga) signaalijaotus FITC detektoris.



11. Analüütiline tulemuslikkus

Täpsus (korduvus ja korratavus)

Analüüsi **reprodutseeritavus** määrati viie operatori saadud andmete põhjal, kes analüüsisid kuue terve vereloovutaja vereproovi samal päeval samades katsetingimustes.

Arvutati järgmised parameetrid:

a) positiivsete granulotsüütide suhtelise arvu määramiseks

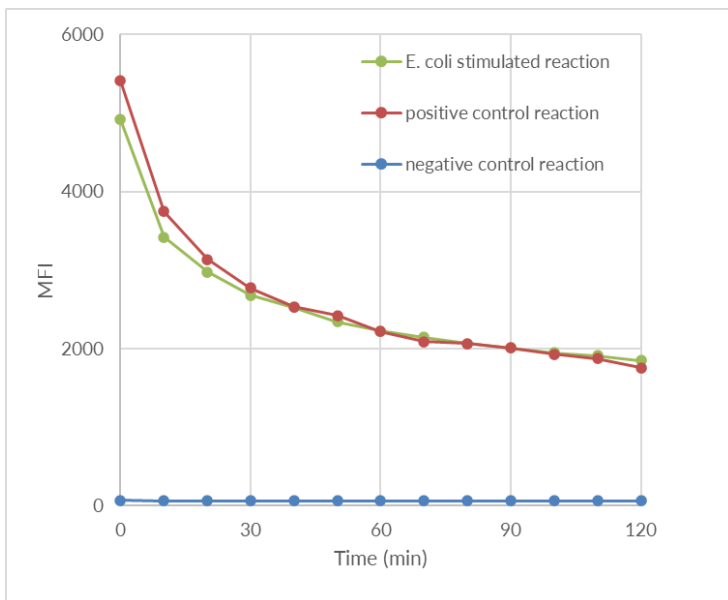
CV = 2%;

b) stimulatsiooniindeksi määramise korral

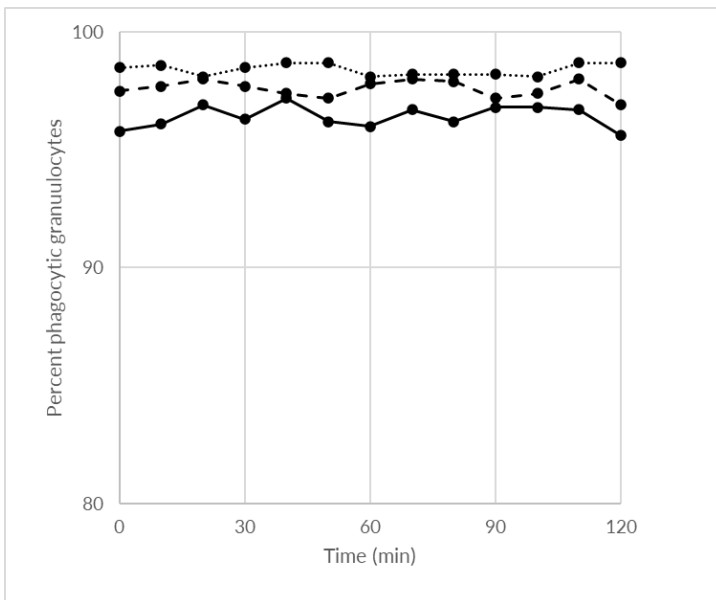
CV = 11%.

Analüüsi **korratavust** ei määratud. R123 rakkudest vabanemisega seotud MFI muutuste dünaamilisuse tõttu (joonised 8, 9, 10) sõltuvad korratavuse väärtused ajast, mis möödus proovi töötlemise (fikseerimine/verelibledel lüüsimine) ja FACSi analüüsi vahel. Soovitav on analüüsida väikseid prooviseeriaid ja analüüsida neid standarditud kitsas ajaaknas. Alternatiivina võib suuremaid seeriaid analüüsida hiljem, nt pärast pikemat ajavahemikku (40 minutit), et vähendada MFI varieeruvust.

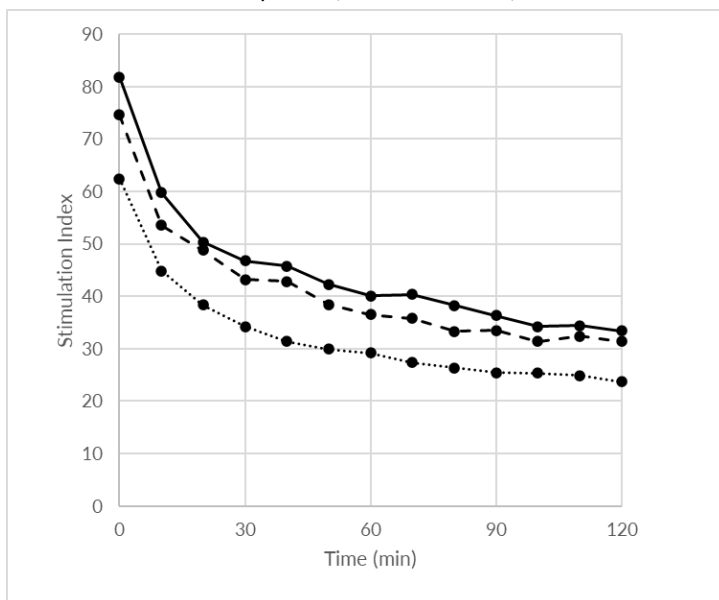
Joonis 8 Granulotsüütide keskmise fluorestsentsi intensiivsuse (MFI) areng ajas pärast erütrotsüütide lüüsimist ühe vereproovi näitel (terve doonor).



Joonis 9 Granulotsüütide fagotsüütilise aktiivsuse (%) areng ajas pärast erütrotsüütide lüüsimist kolme erinevat vereproovi (terved doonorid).



Joonis 10 Stimulatsiooniindeksi areng ajas pärast erütrotsüütide lüüsimist kolme erinevat vereproovi (terved doonorid).



12. Kliiniline tulemuslikkus

Analüüsi hinnati PhagoBursti (Orpegen Pharma GmbH) võrdlusmõõtmiste abil, kasutades kokku 47 patsiendi proove (tabel 4). Mõlemad komplektid olid võimelised tuvastama: a) osakeste neelamise ebaõnnestumist (väike fagotsüütiline aktiivsus) ja b) oksüdatiivse purske häireid (MPO puudulikkus, CGD) 100% tundlikkusega ja 100% spetsiifilisusega.

Tabel 4 Patsientide karakteristikud tulemuslikkuse hindamise uuringus

Patsiendi karakteristik	n
Terve doonor (mitteseotud immunoloogiline häire)	40
CGD (kaks haiget ja üks CGD kandja)	3
MPO puudulikkus	2
Väike fagotsüütiline aktiivsus (haiguse mudel - EDTA antikoagulant)	2
Vanad proovid (tervete doonorite kordusmõõtmised 48 tunni jooksul)	4

13. Eeldatavad väärtused

Granulotsüütide respiratoorse purske normaalvahemik määrati 40 terve täiskasvanu perifeerse vere proovis.

- Respiratoorse purskega granulotsüüdid
90–100%
- Granulotsüütide stimulatsiooniindeks > 30
3. protsentiil = 31
Mediaan = 56
97. protsentiil = 97

Kuna stimulatsiooniindeks võib erinevates laborites ja seadmetes erineda, PEAB iga laboratoorium kindlaks määrama normaalvahemiku, kasutades oma testitingimusi kohalikust normaalsete doonorite populatsioonist võetud proovide puhul.

14. Segavad ained ja piirangud

Antikoagulandid EDTA ja tsitraat mõjutavad analüüsitulemusi negatiivselt.

15. Viited

- 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. Kaubamärgid

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ ja FlowJo™ on Becton, Dickinson and Company registreeritud kaubamärgid, Sysmex™ on Sysmex Corporationi registreeritud kaubamärk, VenturiOne® on Applied Cytometry registreeritud kaubamärk, Infinicyt™ on Cytognos S.L. registreeritud kaubamärk.

17. Muudatuste ajalugu

8. versioon, ED7042_IFU_v8
IFU kujundus muudetud.

18. Tootja

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Tšehhi Vabariik

Kontaktandmed

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

19. Volitatud esindajad

N/A

MÄRKUS. Igast seadmega seotud tõsisest vahejuhtumist tuleb teatada tootjale ja kohalikule pädevale asutusele.