exbio

A Brighter Future in Flow

FagoFlowEx kit – Inovace a změny soupravy

10. 06. 2025, Pavel Jinoch

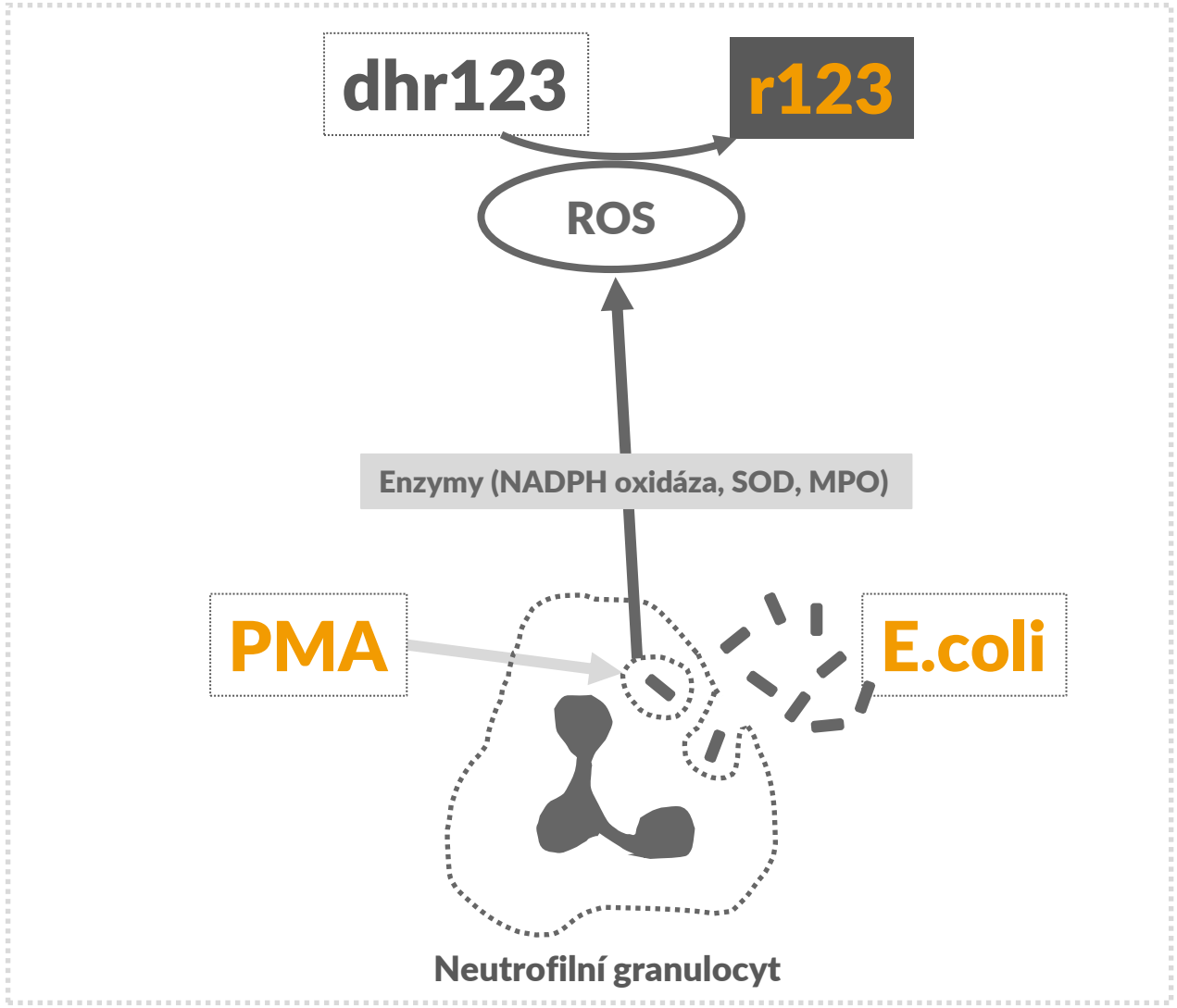
FagoFlowEx Kit, kat.č. ED7042

Funkční test fagocytů pro průtokovou cytometrii

Od roku 2012 certifikát CE IVD

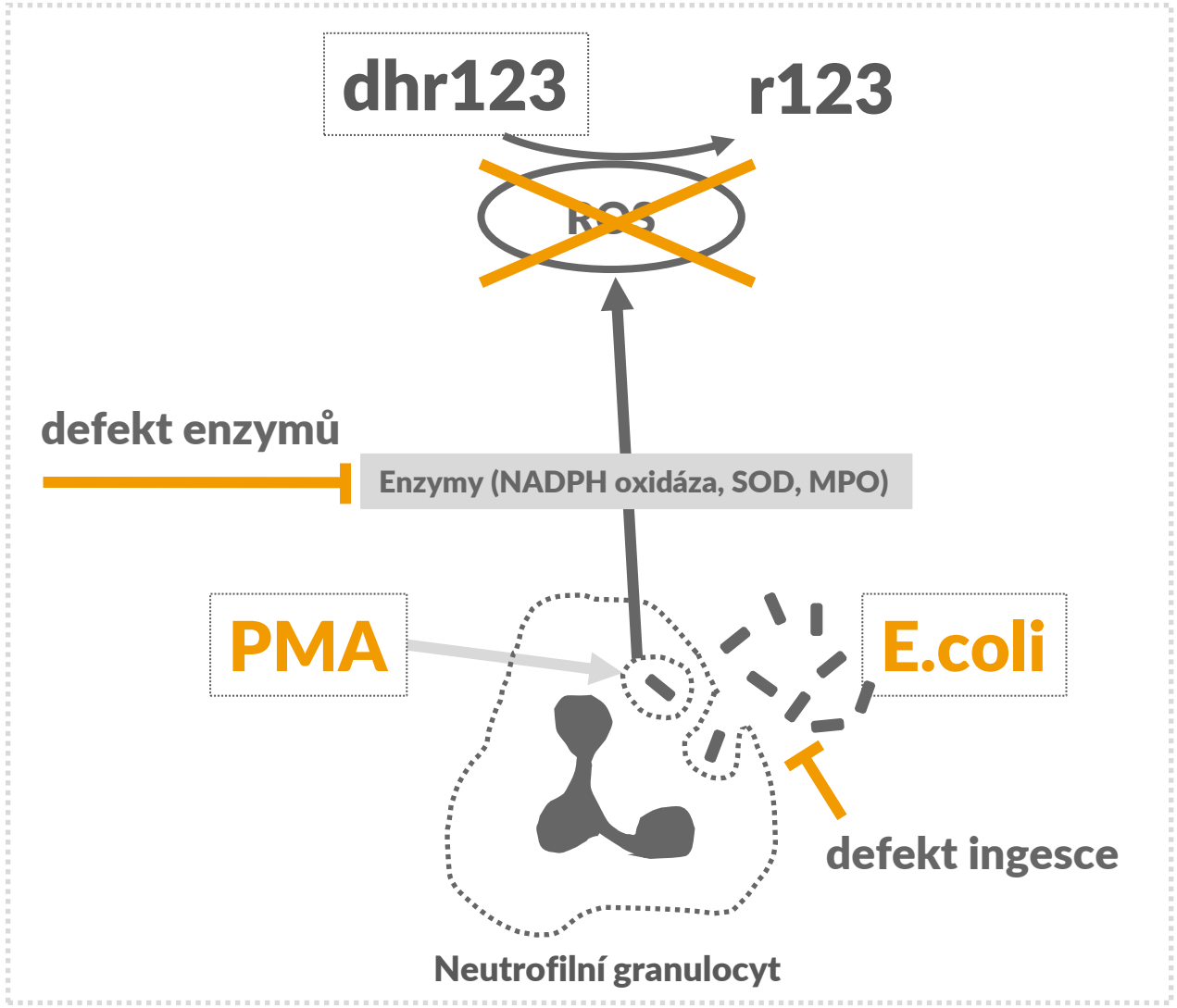
exbio
A Brighter Future in Flow

Princip metody



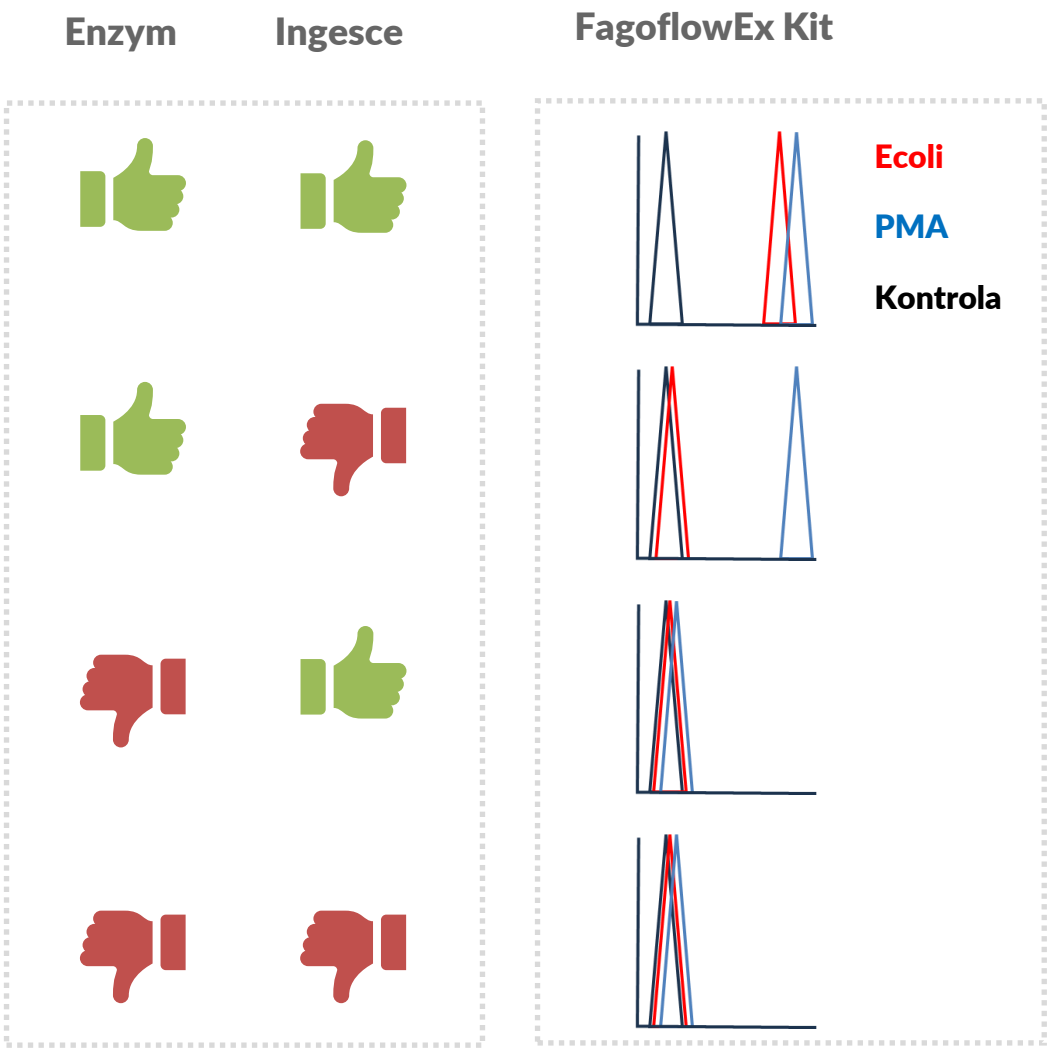
exbio
A Brighter Future in Flow

Princip metody



exbio
A Brighter Future in Flow

Výsledek



% fagocytujících

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

Stimulační Index

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

exbio
A Brighter Future in Flow

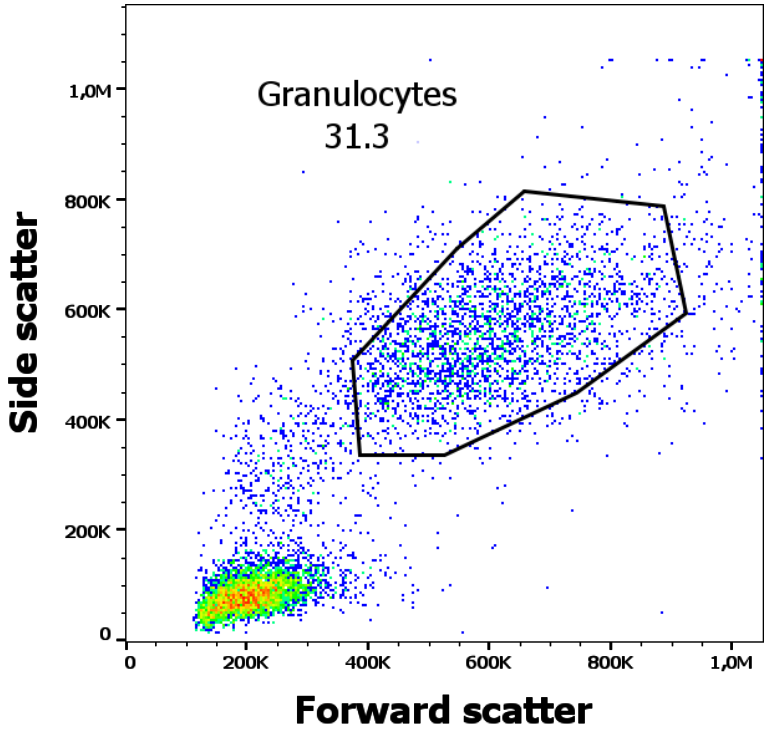
Určený účel použití

Stanovení fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů měřením respiračního (oxidačního) vzplanutí
z plné krve

pomocí průtokové cytometrie

exbio
A Brighter Future in Flow

Vyšetření vzorku

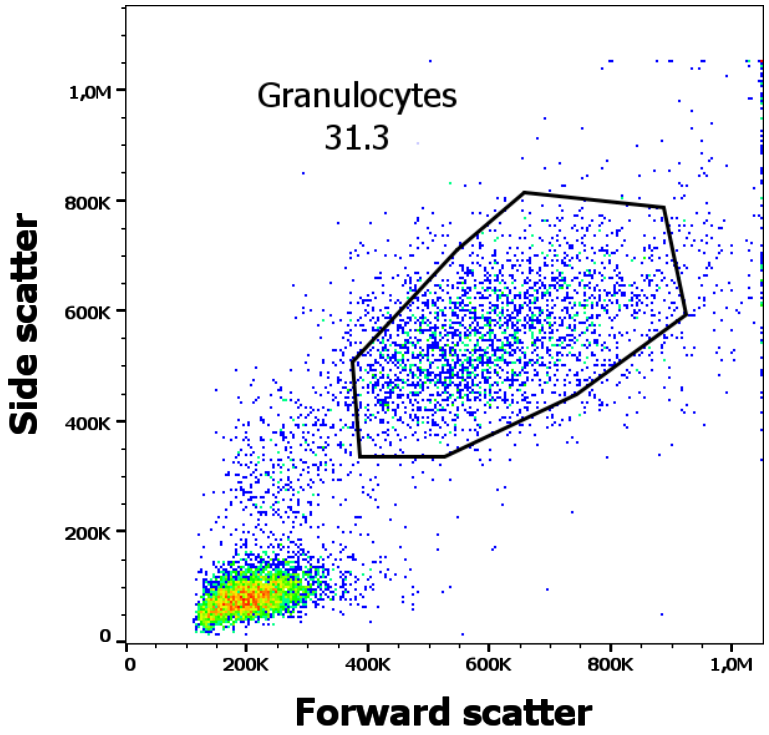


Identifikace granulocytů: Optické scattery

Rok 2012
Cytometer: Cytomics FC500

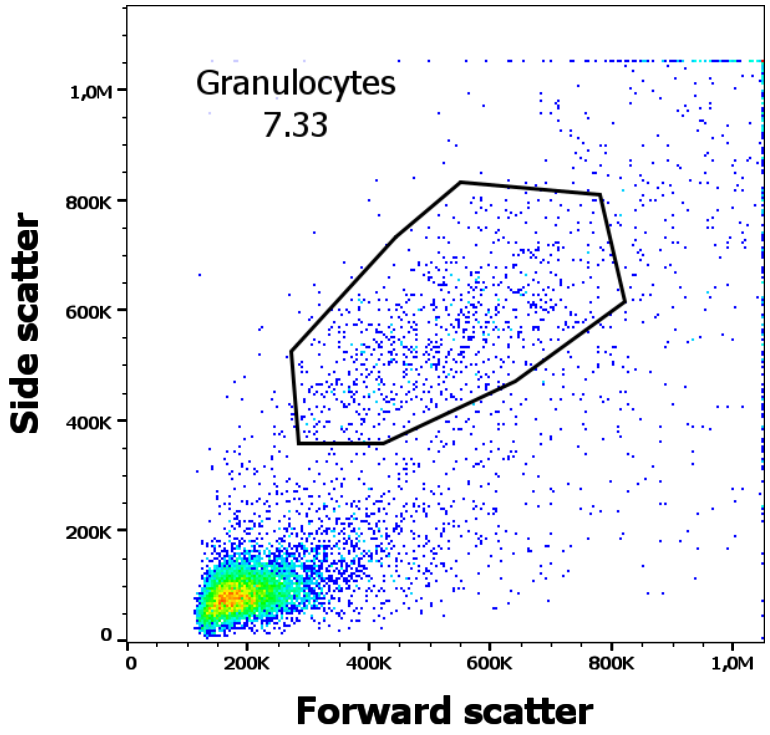
exbio
A Brighter Future in Flow

Kontrola



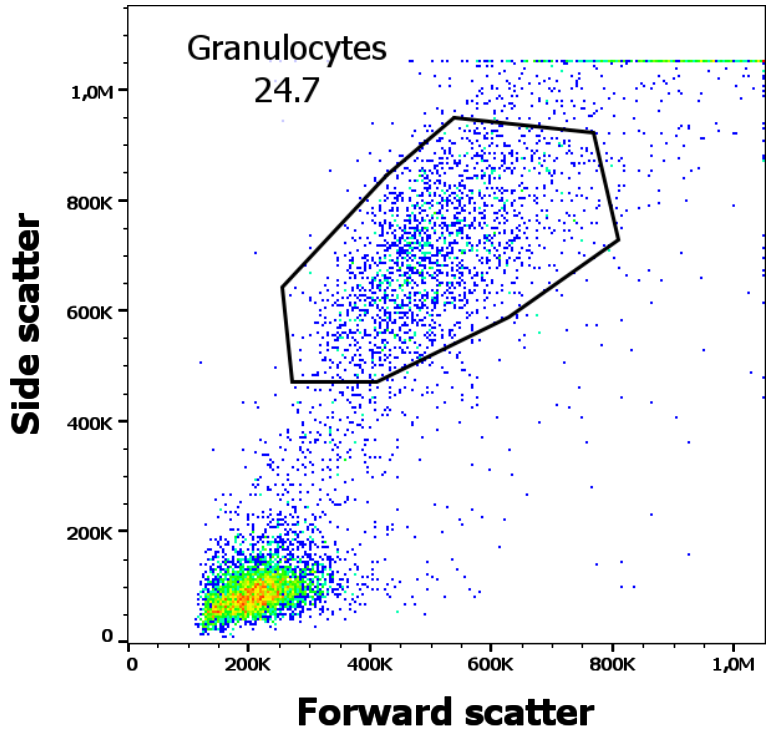
Počet granulocytů:2701

PMA



Počet granulocytů: 872

E.coli

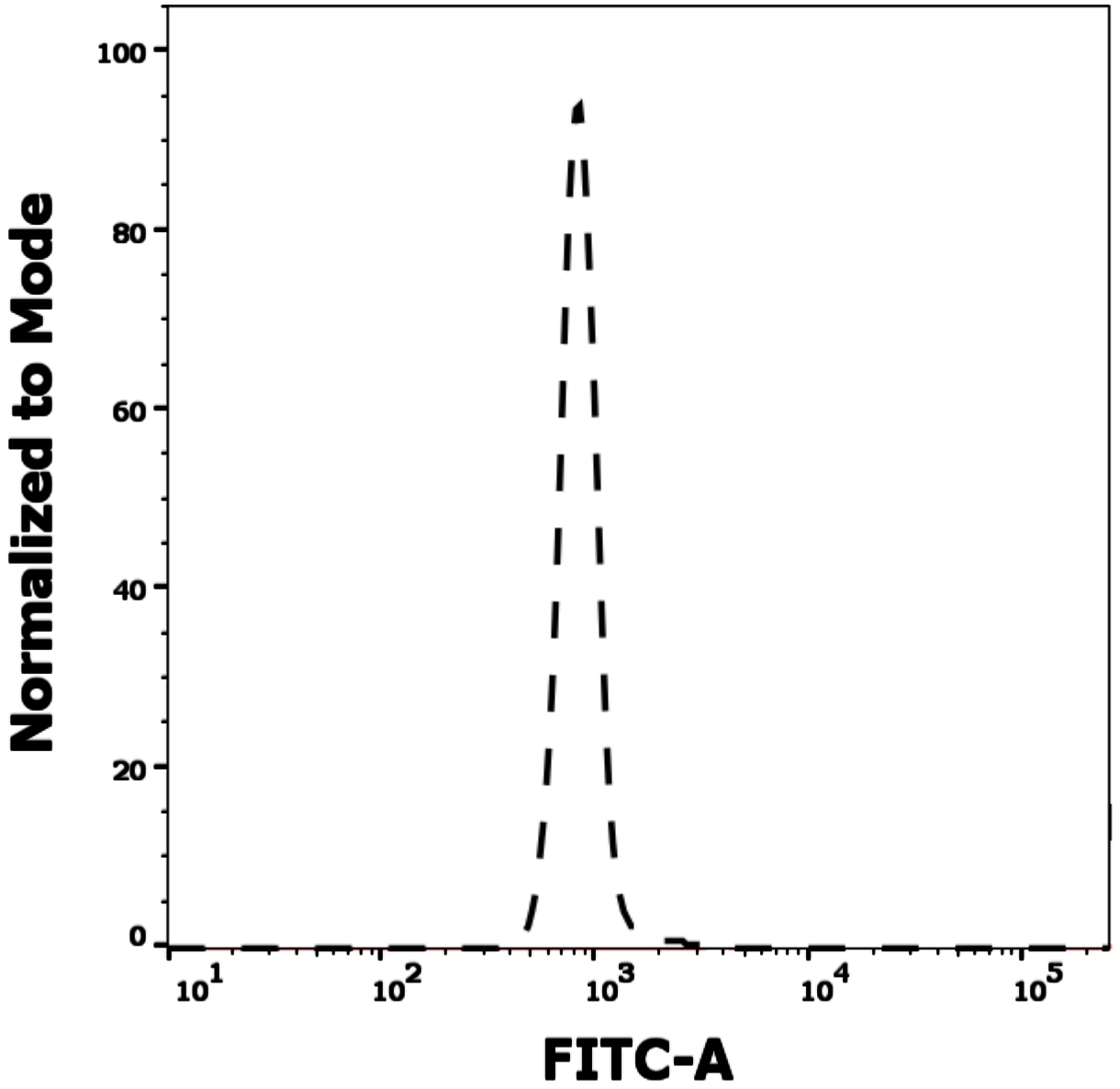


Počet granulocytů: 1979

Rok 2012
Cytometer: Cytomics FC500

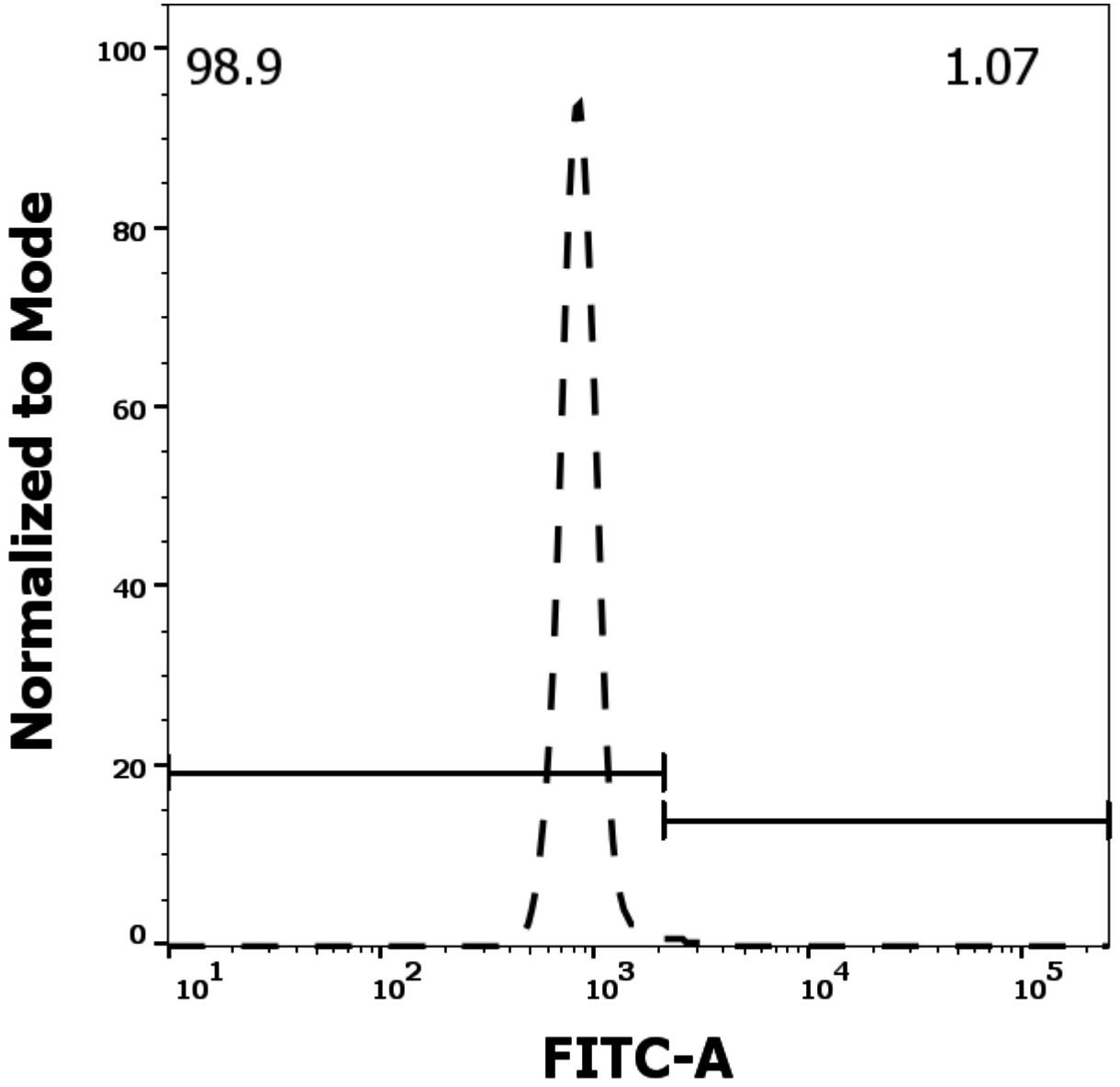
exbio
A Brighter Future in Flow

- Kontrola



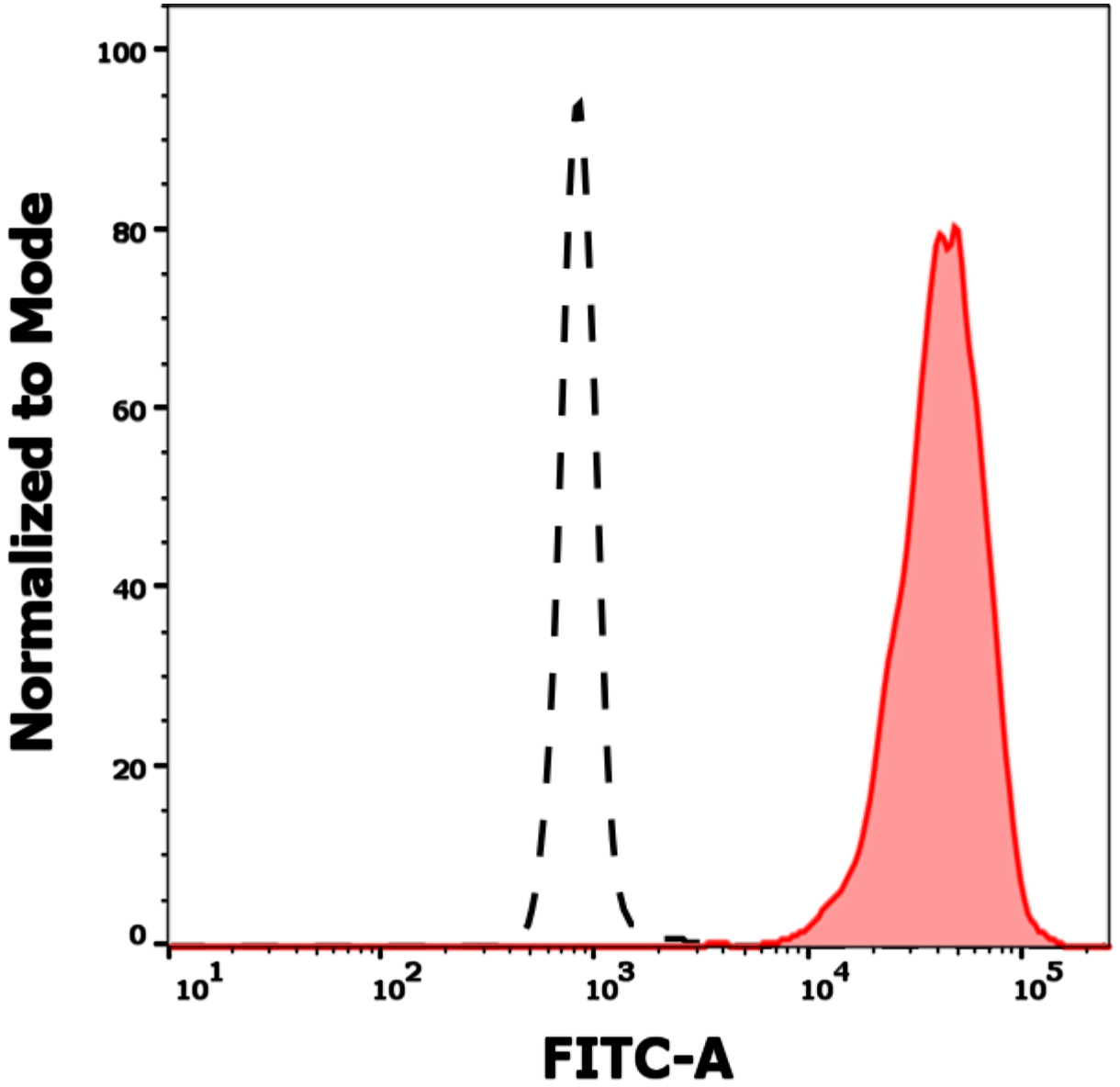
exbio
A Brighter Future in Flow

- Kontrola
- Rozdělení na nestimulované a stimulované



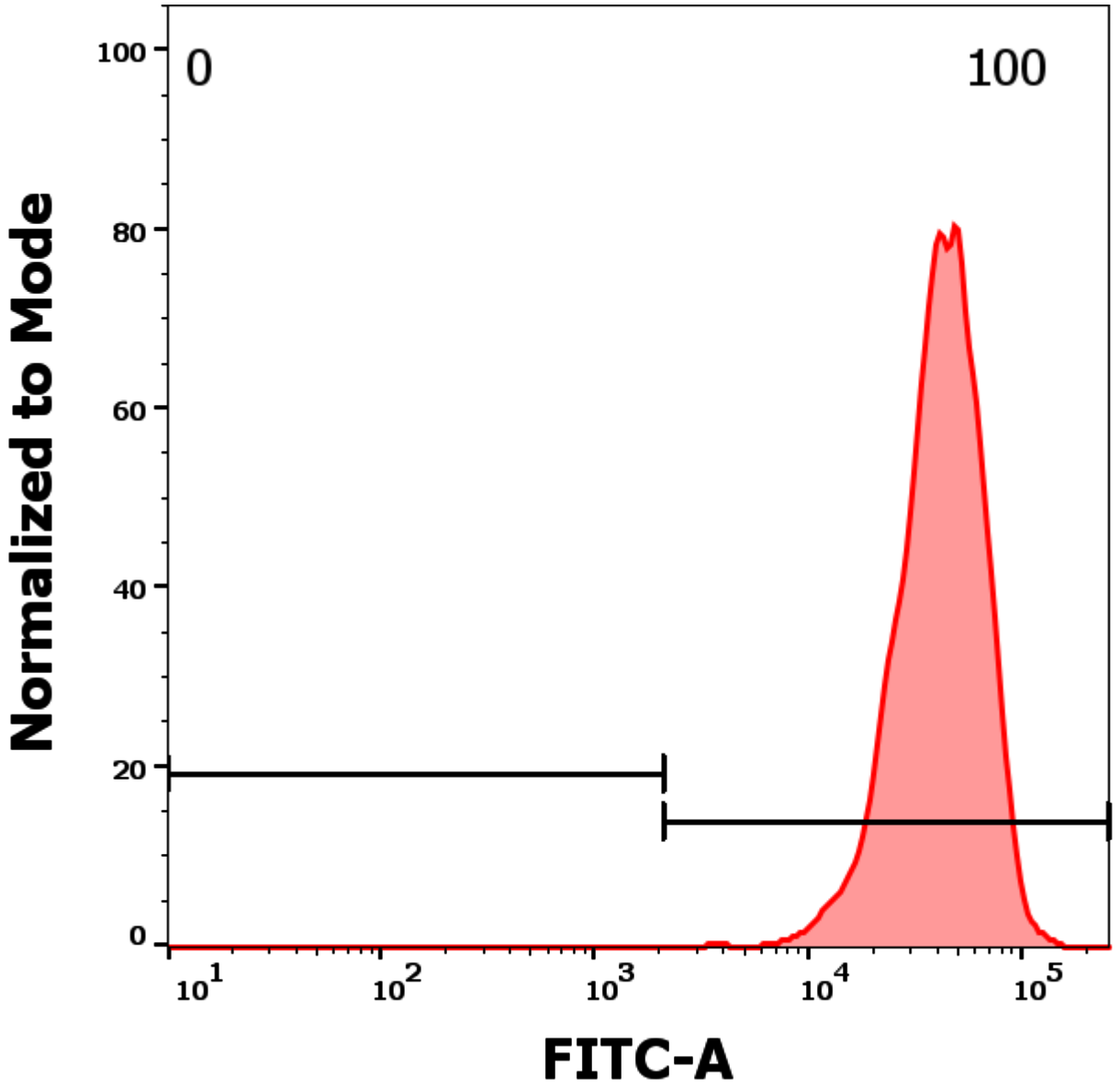
exbio
A Brighter Future in Flow

- Kontrola
- Rozdělení na nestimulované a stimulované
- E.coli



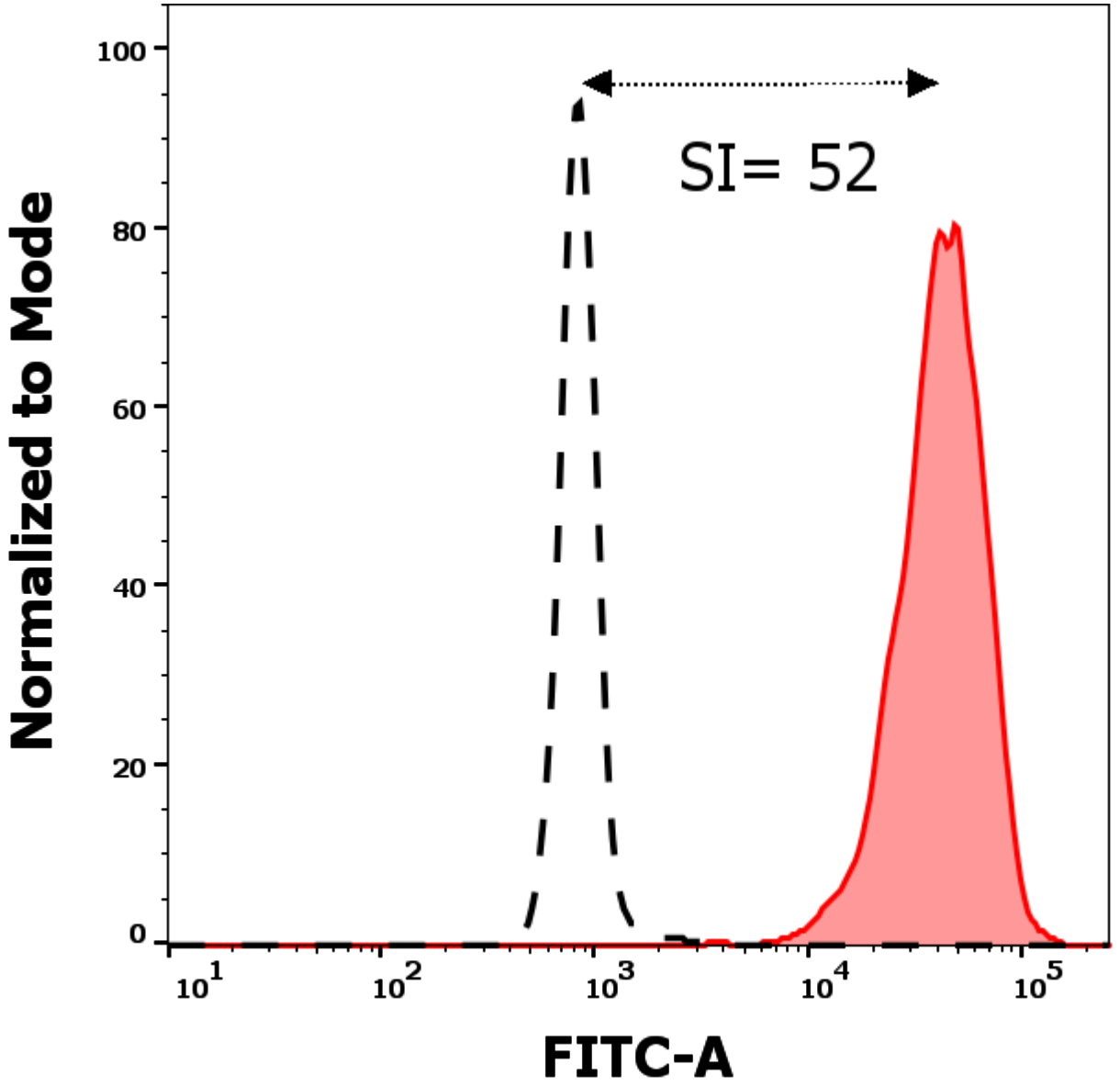
exbio
A Brighter Future in Flow

- Kontrola
- Rozdělení na nestimulované a stimulované
- E.coli
- Počet (%) stimulovaných



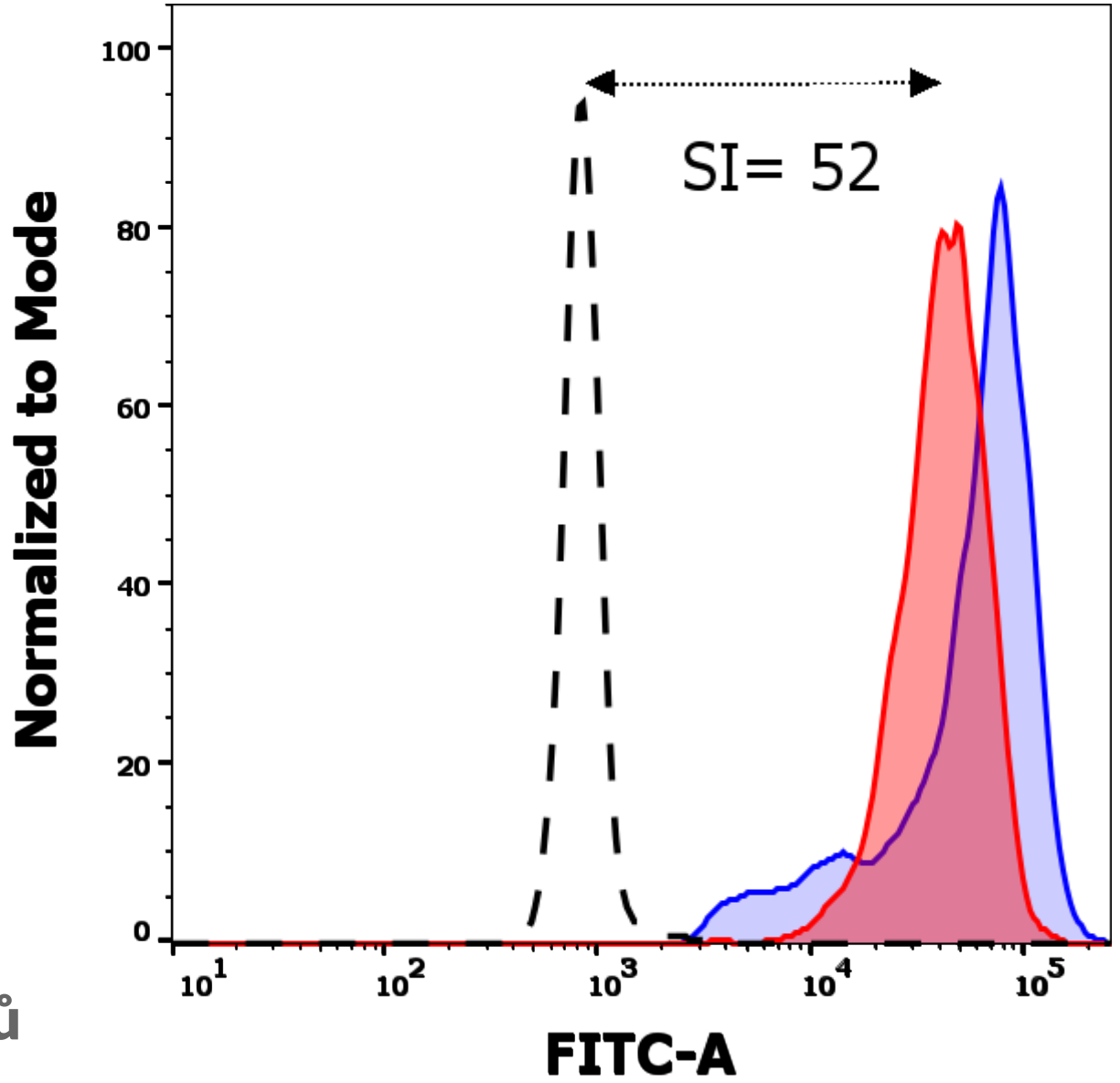
exbio
A Brighter Future in Flow

- Kontrola
- Rozdělení na nestimulované a stimulované
- E.coli
- Počet (%) stimulovaných
- Poměr fluorescence stimulovaných a kontroly (SI)



exbio
A Brighter Future in Flow

- Kontrola
- Rozdělení na nestimulované a stimulované
- E.coli
- Počet (%) stimulovaných
- Poměr fluorescence stimulovaných a kontroly (SI)
- Kontrola enzymů chemickou stimulací (PMA)



exbio
A Brighter Future in Flow

Zákaznické podněty - PMS

- Strmý pokles MFI a SI v čase po zpracování vzorku

- Lyophilizované reagencie mají po rozpuštění krátkou dobu použitelnosti

  1 den (v lednici)

  7 dní (-20 °C)

- Interpretace není jednoznačná (který parameter, % nebo SI, používat?)

exbio
A Brighter Future in Flow

FagoFlowEx Kit prototyp 2025

Plánování a analýza potřeb	Identifikace klinické potřeby Určení zamýšleného použití Analýza trhu, konkurence
Klasifikace prostředku (článek 47, příloha VIII, IVDR)	Rozdělení do tříd A, B, C, D podle rizikovosti
Vývoj a návrh prostředku	Návrh, vývoj a ověření designu
Analytická a klinická validace	Analytická validace - přesnost, opakovatelnost, citlivost, specificita Klinická hodnocení – sběr důkazů o klinické funkci
Posouzení shody	Pro třídy B, C, D zapojení notifikované osoby Prohlášení o shodě
Registrace a uvedení na trh	EUDAMED
Post-market surveillance a vigilance	Plán PMS a pravidelné aktualizace PMS zpráv, Periodic safety Update Report, Sledování incidentů a hlášení závazných incidentů

FagoFlowEx Kit prototyp 2025

Plánování a analýza potřeb	Identifikace klinické potřeby Určení zamýšleného použití Analýza trhu, konkurence
Klasifikace prostředku (článek 47, příloha VIII, IVDR)	Rozdělení do tříd A, B, C, D podle rizikovosti
Vývoj a návrh prostředku	Návrh, vývoj a ověření designu
Analytická a klinická validace	Analytická validace - přesnost, opakovatelnost, citlivost, specificita Klinická hodnocení – sběr důkazů o klinické funkci
Posouzení shody	Pro třídy B, C, D zapojení notifikované osoby Prohlášení o shodě
Registrace a uvedení na trh	EUDAMED
Post-market surveillance a vigilance	Plán PMS a pravidelné aktualizace PMS zpráv, Periodic safety Update Report, Sledování incidentů a hlášení závazných incidentů

Seznam zdravotních výkonů (szv.mzcr.cz, z 03.06.2025)

Klinická potřeba

Fagocytóza (ingesce)

91551	STANOVENÍ FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITY METODOU PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE
91449	STANOVENÍ FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITY LEUKOCYTŮ INGESCÍ PARTIKULÍ (JEDEN SUBSTRÁT)

Oxidační vzplanutí (enzymy)

91553	STANOVENÍ OXYDATIVNÍHO VZPLANUTÍ GRANULOCYTŮ METODOU PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

exbio
A Brighter Future in Flow

Klinický účel použití

Disease names are presented in red

An asterisk is added to highlight extremely rare disorders

J Hum Immun. 2025;1(1). doi:10.70962/jhi.20250002

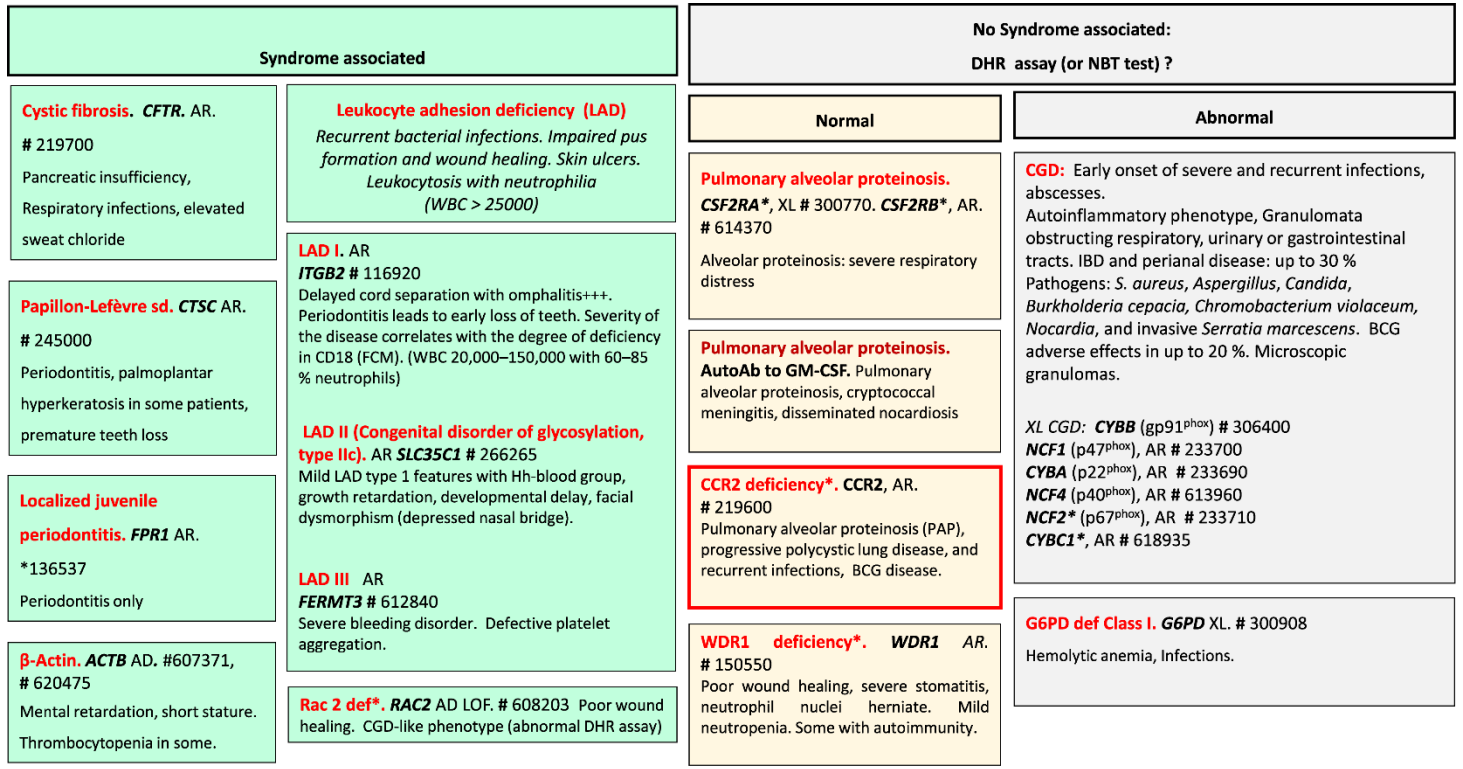


Figure Legend:

Congenital defects of phagocyte number, function, or both. Functional defects of phagocytes.

AD: autosomal dominant inheritance; AR: autosomal recessive inheritance; BCG: Bacillus Calmette–Guerin; CD: cluster of differentiation; CGD: chronic granulomatous disease; FCM: flow cytometry; def: deficiency; DHR: dihydrorhodamine-1,2,3; GM-CSF: granulocyte/monocyte colony stimulation factor; IBD: inflammatory bowel disease; LAD: leukocyte adhesion deficiency; NBT: nitroblue tetrazolium; NK: natural killer cells; WBC: white blood cells; XL: X-linked inheritance. A searchable PDF file containing all figures in this article can be found under the “Supplements” tab.

Rockefeller University Press

From: **The 2024 update of IUIS phenotypic classification of human inborn errors of immunity**

IUIS
International Union of Immunological Societies

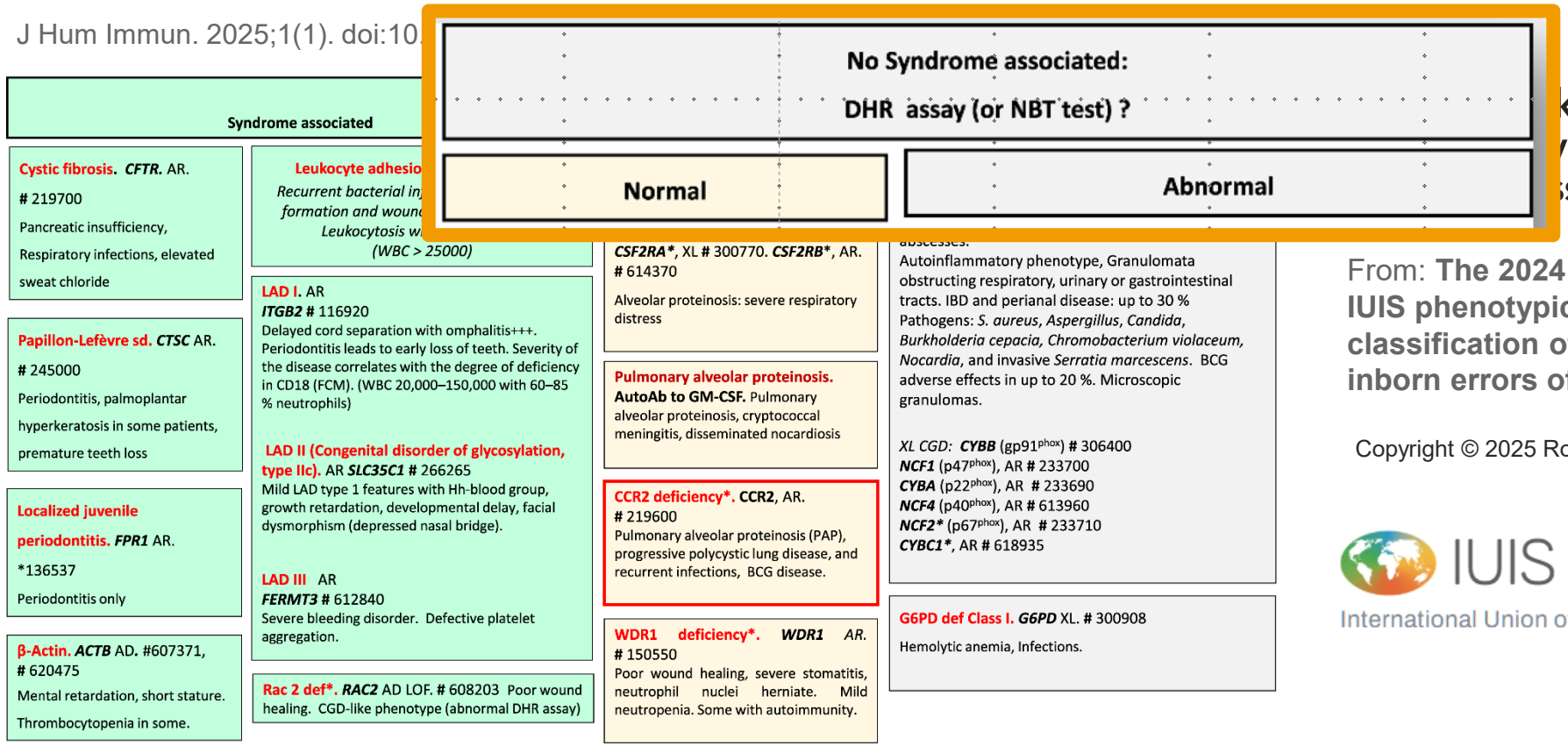
exbio
A Brighter Future in Flow

Klinický účel použití

Disease names are presented in red

An asterisk is added to highlight extremely rare disorders

J Hum Immun. 2025;1(1). doi:10.



From: **The 2024 update of IUIS phenotypic classification of human inborn errors of immunity**

IUIS
International Union of Immunological Societies

Figure Legend:

Congenital defects of phagocyte number, function, or both. Functional defects of phagocytes.

AD: autosomal dominant inheritance; AR: autosomal recessive inheritance; BCG: Bacillus Calmette–Guerin; CD: cluster of differentiation; CGD: chronic granulomatous disease; FCM: flow cytometry; def: deficiency; DHR: dihydrorhodamine-1,2,3; GM-CSF: granulocyte/monocyte colony stimulation factor; IBD: inflammatory bowel disease; LAD: leukocyte adhesion deficiency; NBT: nitroblue tetrazolium; NK: natural killer cells; WBC: white blood cells; XL: X-linked inheritance. A searchable PDF file containing all figures in this article can be found under the “Supplements” tab.

Klinický účel použití

Disease names are presented in red

An asterisk is added to highlight extremely rare disorders

J Hum Immun. 2025;1(1). doi:10.70962/jhi.20250002

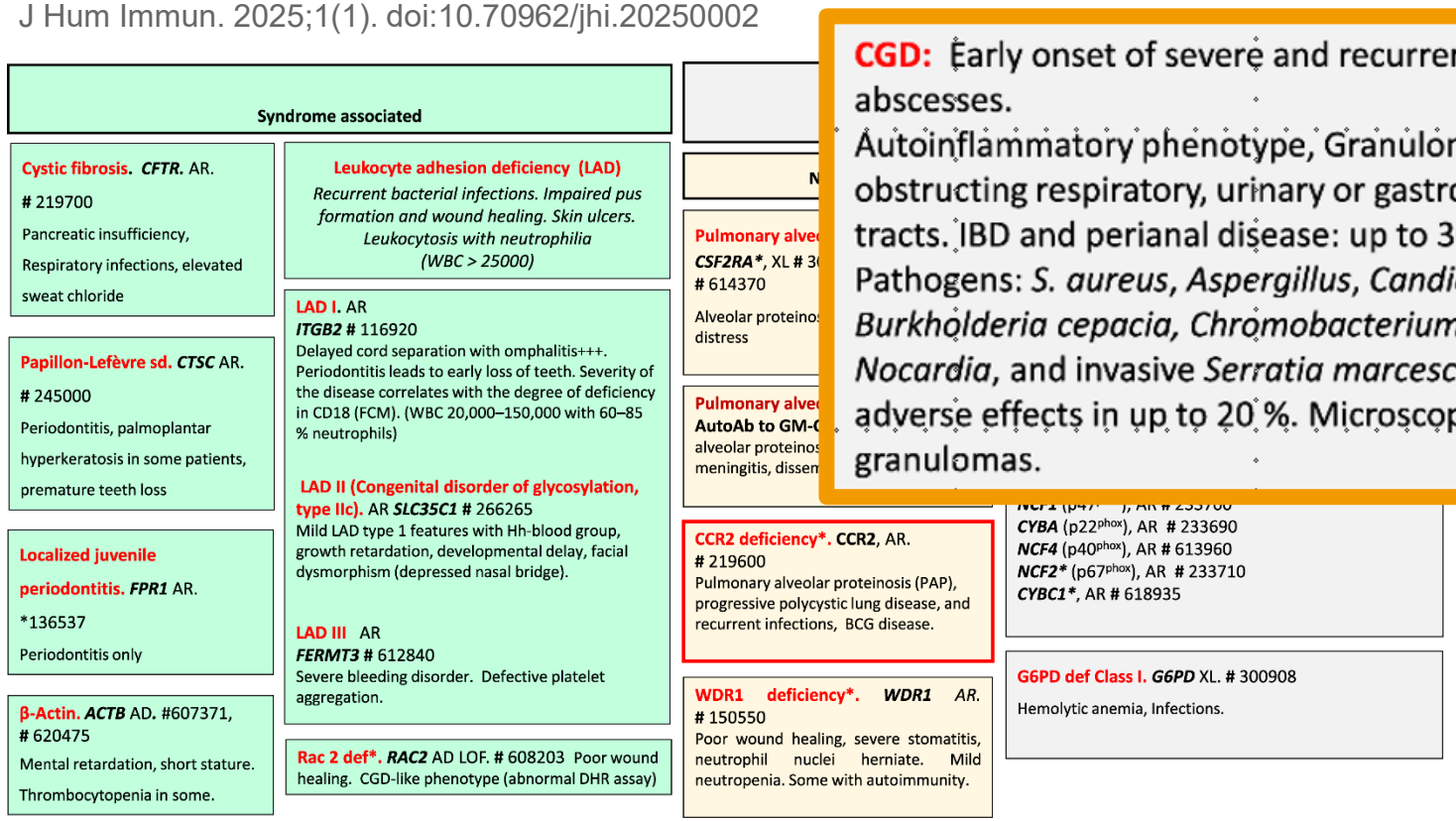


Figure Legend:

Congenital defects of phagocyte number, function, or both. Functional defects of phagocytes.

AD: autosomal dominant inheritance; AR: autosomal recessive inheritance; BCG: Bacillus Calmette–Guerin; CD: cluster of differentiation; CGD: chronic granulomatous disease; FCM: flow cytometry; def: deficiency; DHR: dihydrorhodamine-1,2,3; GM-CSF: granulocyte/monocyte colony stimulation factor; IBD: inflammatory bowel disease; LAD: leukocyte adhesion deficiency; NBT: nitroblue tetrazolium; NK: natural killer cells; WBC: white blood cells; XL: X-linked inheritance. A searchable PDF file containing all figures in this article can be found under the “Supplements” tab.

Klinický účel použití

Disease names are presented in red

An asterisk is added to highlight extremely rare disorders

J Hum Immun. 2025;1(1). doi:10.70962/jhi.20250002

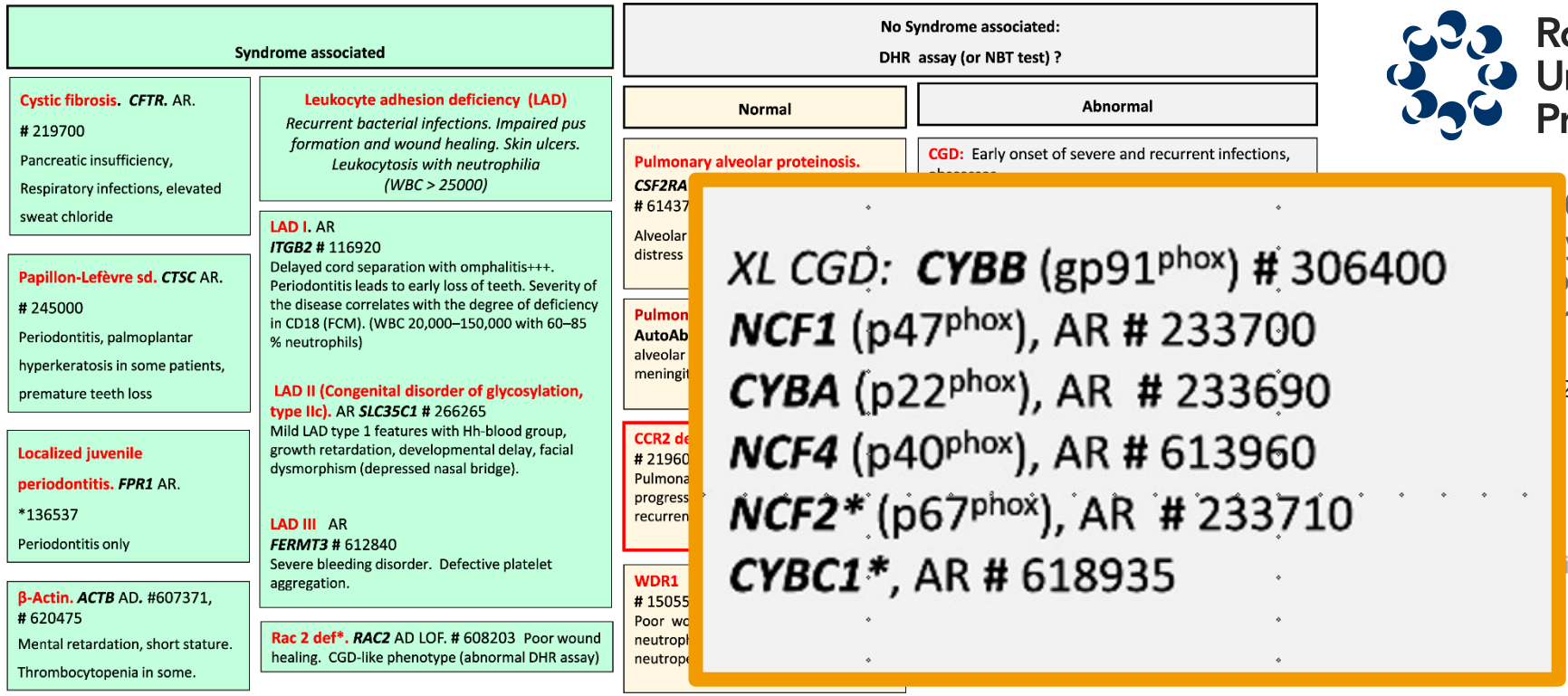


Figure Legend:

Congenital defects of phagocyte number, function, or both. Functional defects of phagocytes.

AD: autosomal dominant inheritance; AR: autosomal recessive inheritance; BCG: Bacillus Calmette–Guerin; CD: cluster of differentiation; CGD: chronic granulomatous disease; FCM: flow cytometry; def: deficiency; DHR: dihydrorhodamine-1,2,3; GM-CSF: granulocyte/monocyte colony stimulation factor; IBD: inflammatory bowel disease; LAD: leukocyte adhesion deficiency; NBT: nitroblue tetrazolium; NK: natural killer cells; WBC: white blood cells; XL: X-linked inheritance. A searchable PDF file containing all figures in this article can be found under the “Supplements” tab.

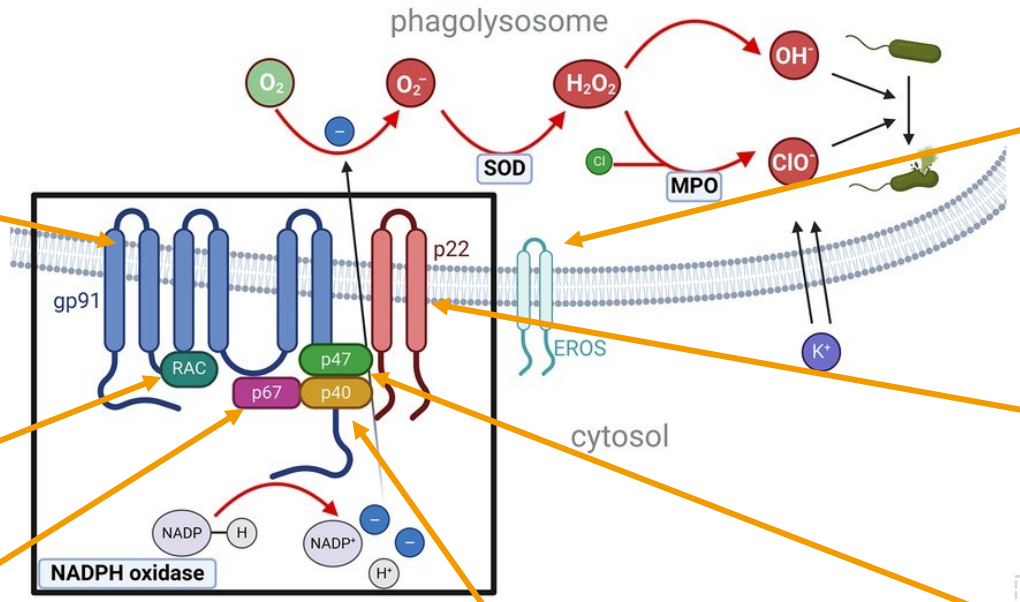
Staudacher O, von Bernuth H. Front Pediatr. 2024 Jun 28;12:1384550. doi: 10.3389/fped.2024.1384550.

Rider NL, Jameson MB, Creech CB. J Pediatric Infect Dis Soc. 2018 May 9;7(suppl_1):S2-S5. doi: 10.1093/jpids/piy008

Defekt oxidačního vzplanutí (CGD)

CYBB
CYTOCHROME b(558), BETA SUBUNIT
p91-PHOX
NADPH OXIDASE 2; NOX2
GP91-1
Xp21.1-p11.4

70%



CYTOCHROME b(-254) CHAPERONE 1; CYBC1
17q25.3

CYBA (CYTOCHROME b(558), ALPHA SUBUNIT
p22-PHOX
CYTOCHROME b LIGHT CHAIN)
16q24.2

RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 2; RAC2
22q13.1

NEUTROPHIL CYTOSOLIC FACTOR 1; NCF1
7q11.23

25%

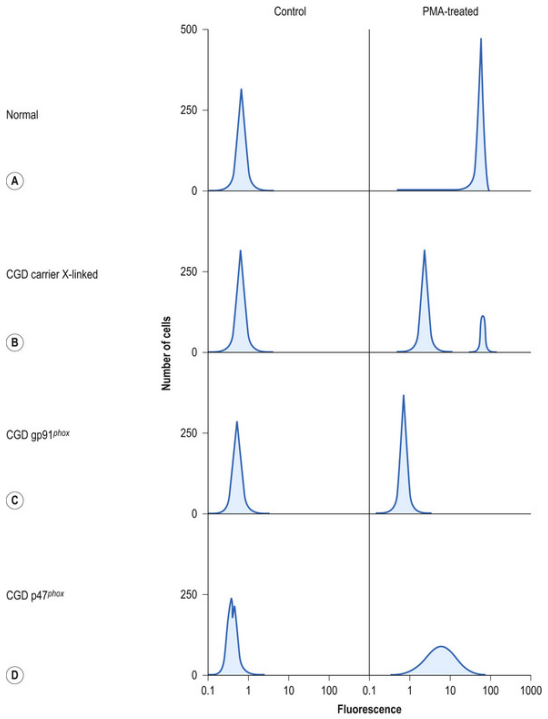
NEUTROPHIL CYTOSOLIC FACTOR 2; NCF2
1q25.3

NEUTROPHIL CYTOSOLIC FACTOR 4; NCF4
Alternative titles; symbols
NCF, 40-KD
p40-PHOX
22q12.3

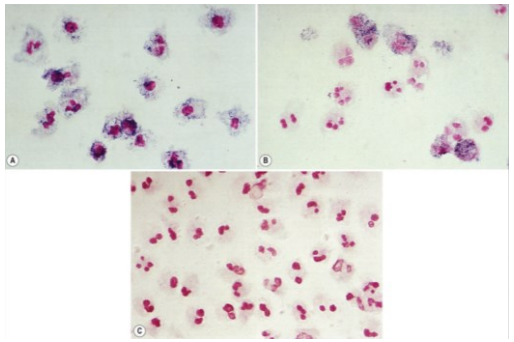
exbio
A Brighter Future in Flow

Testy oxidačního vzplanutí – konkurence

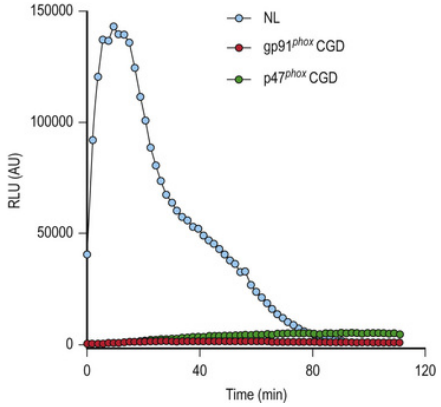
dhr assay



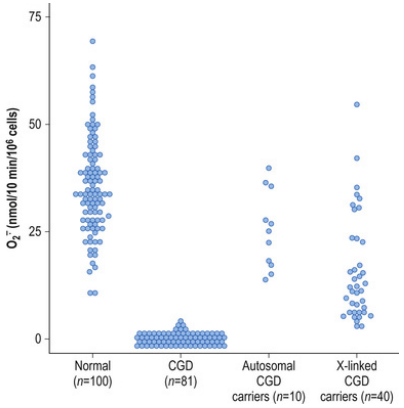
NBT

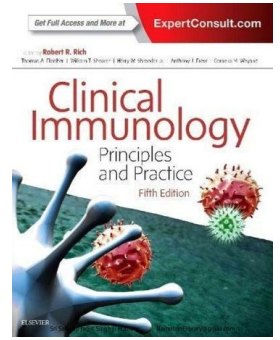


cytochrom c



luminol



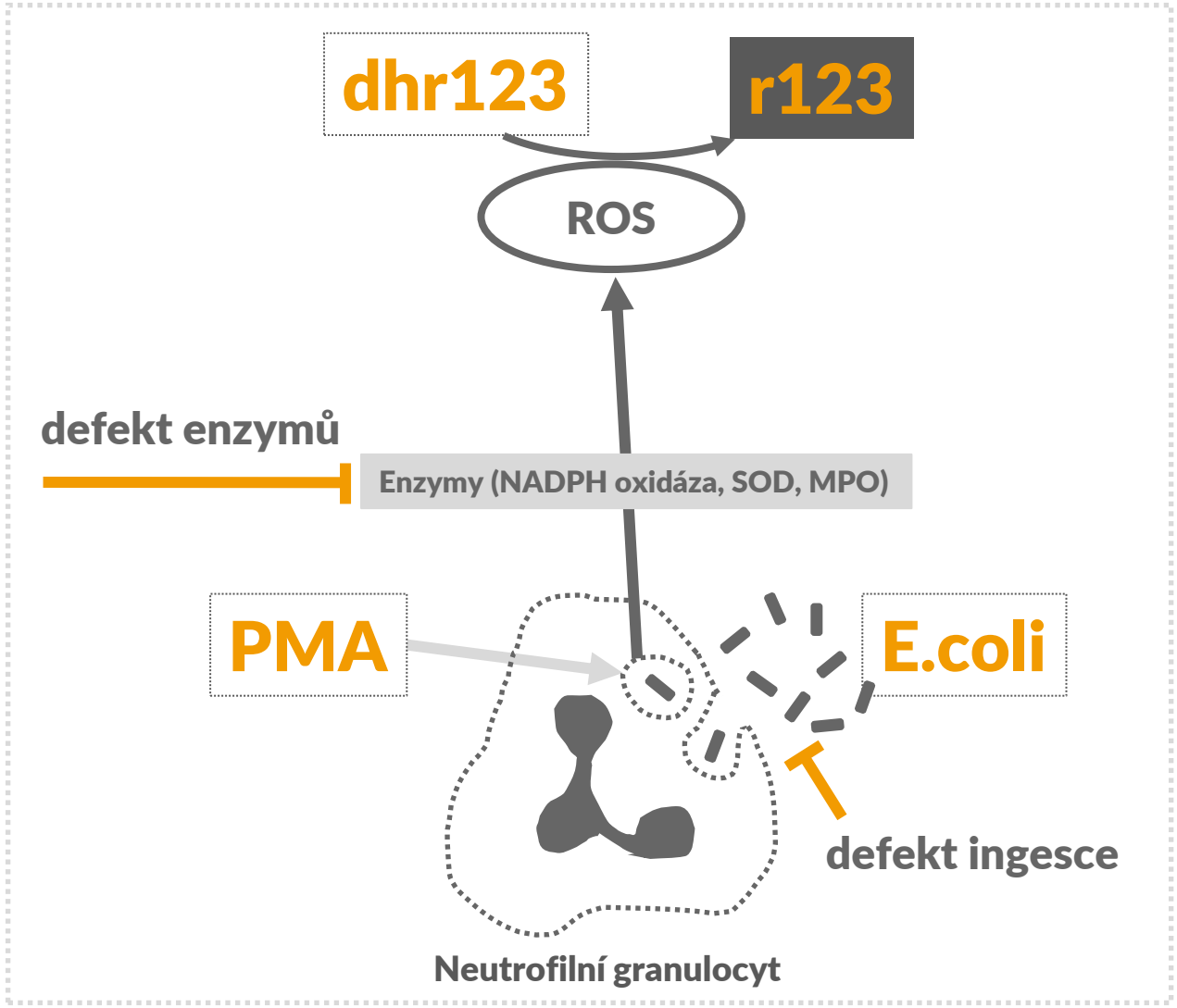


(2019)

exbio
A Brighter Future in Flow

Klasifikace dle účelu použití

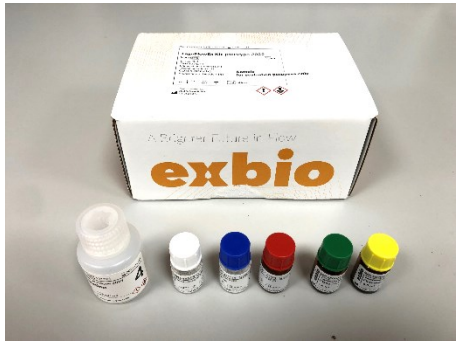
třída C



?

exbio
A Brighter Future in Flow

FagoFlowEx Kit prototyp 2025



Složení

- E.Coli
- PMA
- DHR123
- Lysing solution
- CD45
- Fluorescenční standard

Vlastnosti

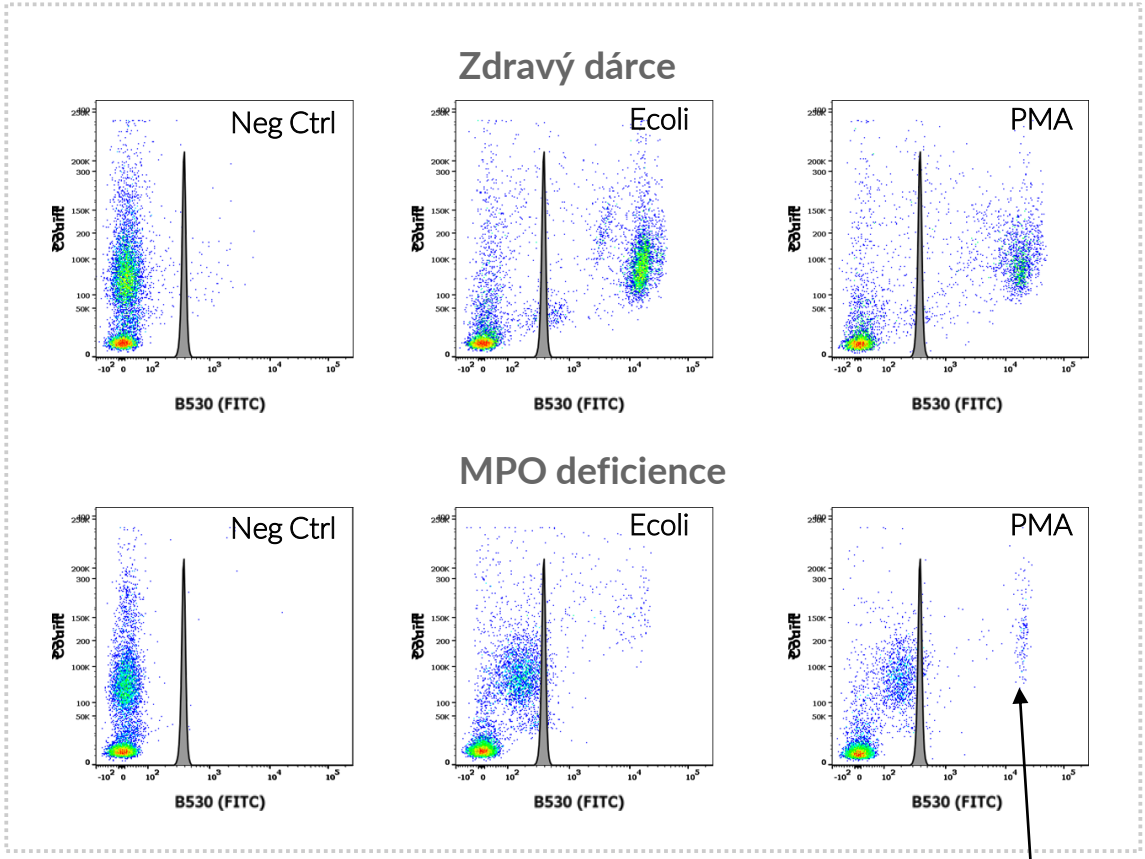
- Isotonická „lýza“ erytrocytů
- Stálý signál
- Skladování rekonstituovaných komponent v lednici
- Kvantifikace oxidačního vzplanutí ve vztahu k fluorescenčnímu standardu

Postup

1. Příprava zkumavek
2. DHR123
3. Stimulans
4. Vzorek krve
5. Inkubace 30 min/37stC
6. Lyzační roztok
7. PBS
8. CD45
9. Inkubace 20min
10. Měření

exbio
A Brighter Future in Flow

Oxidační vzplanutí prototyp 2025



Oxidační vzplanutí – vyhodnocení (poměr MFI/standard)

Zdravý dárce

PMA kontrola = 43

E.coli reakce = 40

MPO deficience

PMA kontrola =0.5

E.coli reakce = 0.4

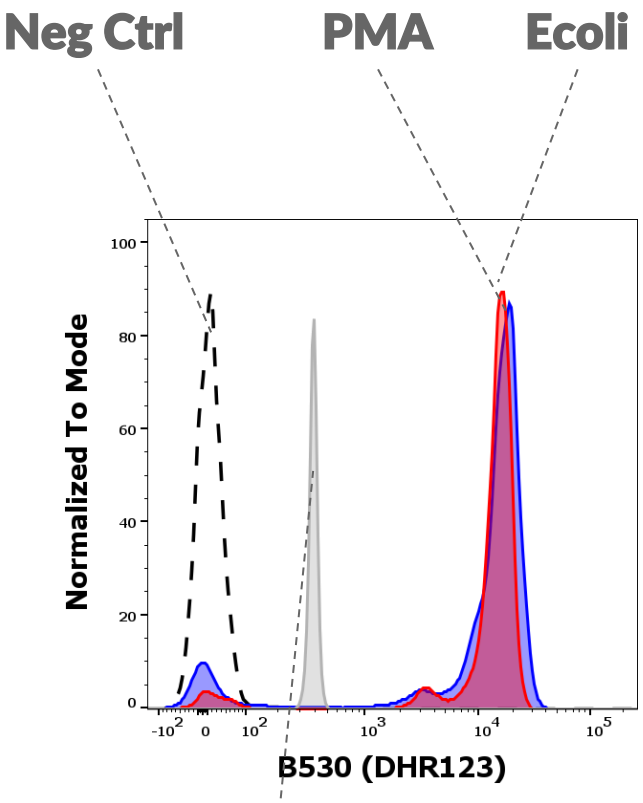
Oxidace DHR123 katalyzovaná eosinofilní peroxidázou u MPOd vzorku

FagoFlowEx Kit prototyp 2025

exbio

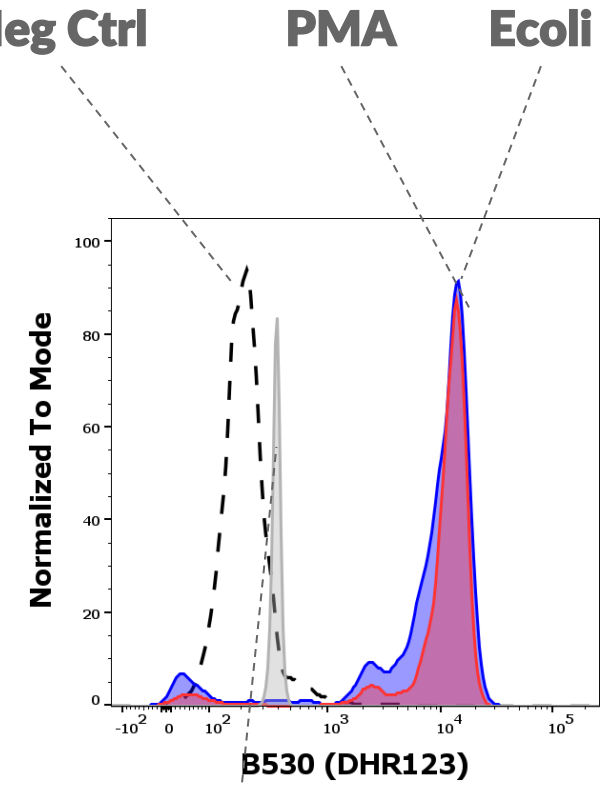
A Brighter Future in Flow

Čerstvě rozpuštěné



Fluorescenční kuličky 7th peak

4 týdny v lednici

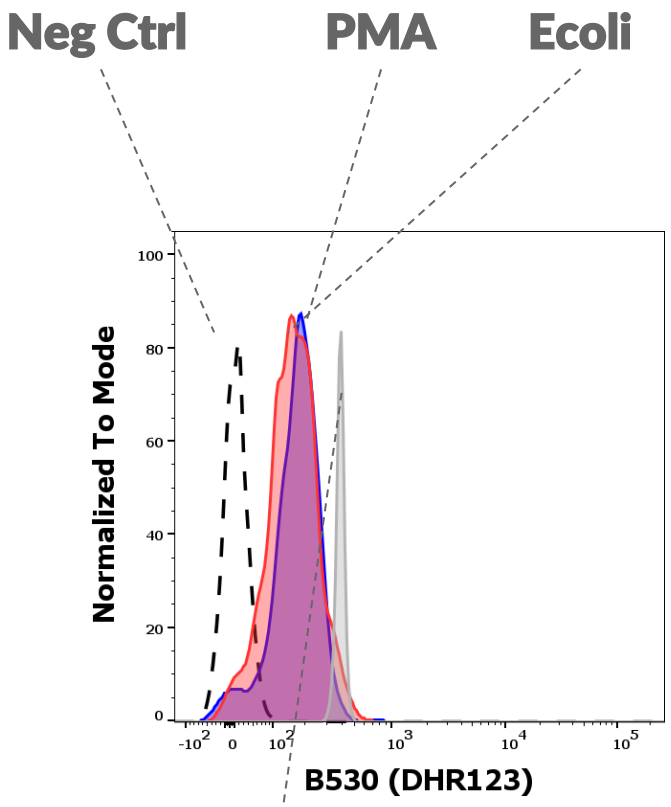


Fluorescenční kuličky 7th peak

FagoFlowEx Kit prototyp 2025

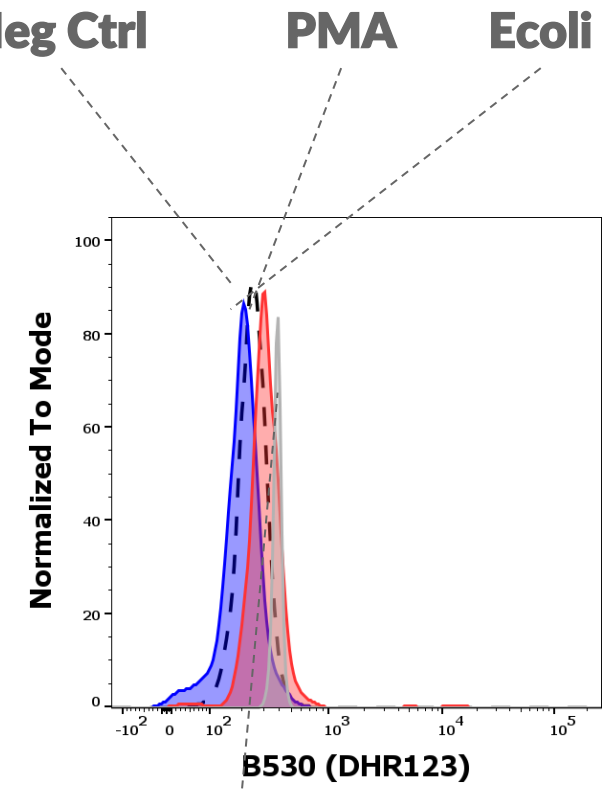
exbio
A Brighter Future in Flow

Čerstvě rozpuštěné



Fluorescenční kuličky 7th peak

4 týdny v lednici

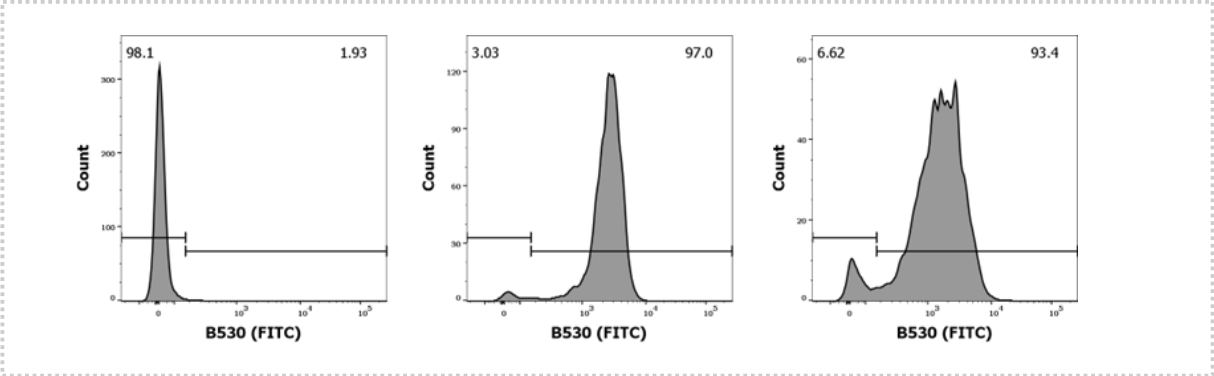


Fluorescenční kuličky 7th peak

FagoFlowEx Kit prototyp 2025

exbio
A Brighter Future in Flow

Ingesce / fagocytóza prototyp 2025



Ingesce / Fagocytóza - vyhodnocení

Negativní kontrola = 1.9%

PMA kontrola =97%

E.coli reakce = 93%

FagoFlowEx Kit prototyp 2025

exbio

A Brighter Future in Flow

Shrnutí

- FagoFlowEx kit bude inovován podle zákaznické zpětné vazby z PMS aktivit
- Souprava bude přizpůsobena diagnostice klinicky závažných imunodeficitů
- Vývoj ve fázi externího ověřování designu

exbio
A Brighter Future in Flow