



# FagoFlowEx<sup>®</sup> Kit (100 tests / testů / testov)

Cat. No. / Kat. č.: ED7042

## ENGLISH

### 1. Intended use

The FagoFlowEx<sup>®</sup> Kit is intended for the **examination of phagocytic activity** of neutrophil granulocytes by measuring the respiratory (oxidative) burst after their stimulation with *E. coli* bacteria in human heparinized whole blood using flow cytometry.

### 2. Introduction

Immune deficient patients are initially detected clinically by a history of recurrent infection. The responsible specific infectious agent is a guide to which part of the immune system is being affected. Deficiencies of innate immune system consist mainly of complement and phagocyte dysfunction and seriously dampen our ability to combat infections despite an apparently effective adaptive immune response.

Besides diverse migration defects, the most common genetic defects of innate immune system target phagocytic and killing activities of neutrophil granulocytes, monocytes and macrophages based on myeloperoxidase (MPO) deficiency [1], chronic granulomatous disease (CGD) [2] and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) syndromes [3]. All of these deficiencies lead to serious chronic infections of specific pathogens (bacteria, yeast and fungi) that are resistant to standard treatment.

The respiratory burst is impaired in CGD, MPO, and G6PD deficiencies. Altogether these genetic disorders prevent the oxidative environment accumulation and hence the phagocytes are not capable of effectively destroying intracellular or ingested extracellular pathogens.

Chronic granulomatous disease (CGD) is clinically and genetically a diverse group of hereditary diseases with deficiency in multiple enzymes of the NADPH oxidase cascade generating reactive oxygen radicals used for the pathogen killing. Approximately 1/3 of CGD patients harbor autosomal recessive mutations (*CYBA*, *NCF1*, *NCF2*) and two-thirds of CGD cases result from defects in the X-linked *CYBB* gene encoding the gp91<sup>phox</sup> subunit of flavocytochrome b<sub>558</sub> [4, 5]. Active NADPH oxidase of healthy individual catalyses NADPH reaction with oxygen, producing NADP<sup>+</sup> and superoxide radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>, which undergoes a further series of reactions to produce singlet oxygen and hydrogen peroxide, later transformed by MPO. CGD patients suffer from pneumonia, abscesses of the skin, tissues, and organs, suppurative arthritis, osteomyelitis, bacteremia/fungemia and superficial skin infections such as cellulitis or impetigo [6]. Moreover, the persistent infection can

lead to the formation of tissue granulomas based on overt CD4<sup>+</sup> T cell-produced cytokines TNF and IFN $\gamma$ . Importantly, CGD patients not only suffer from recurrent infections, but also present with excessive inflammatory, non-infectious conditions on the other hand [7].

MPO deficiency is a genetic disorder featuring deficiency, either in quantity or function, of a downstream myeloperoxidase enzyme generating hydroxyl radical and hypochlorite from the hydrogen peroxide. Hypochlorite is considered the most effective killing agent produced during a respiratory burst [8].

The G6PD enzyme is in the upstream hexose monophosphate pathway – one of the major NADPH-generation processes. It is linked both to chronic nonspherocytic hemolytic anemia as well as decreased phagocyte respiratory burst [9] if the enzyme activity is low.

All the above mentioned diseases related to phagocyte function illustrate their critical role in the removal and killing of pathogens while maintaining homeostasis in human organism.

### 3. Principle

This test is based on the measurement of respiratory burst of neutrophil granulocytes after their stimulation with *E. coli* bacteria. During the process of bacteria ingestion, phagocytes activate the NADPH oxidase producing reactive oxidative intermediates (respiratory burst). Resulting hypochlorite ions inside phagocytes strongly oxidize dihydrorhodamine 123 (DHR123) into fluorescent rhodamine 123 which is detected by a flow cytometer. In the case of MPO deficiency, DHR123 is oxidized with less intensity by other oxidative products resulting in lower fluorescence intensity of stimulated granulocytes. A positive control sample is stimulated using PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) which activates respiratory burst of granulocytes without adhesion and ingestion of the pathogen.

### 4. Precautions

- Intended for In Vitro Diagnostic use in laboratories outside USA and Canada. This CE-IVD kit is in conformity with the European In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/EC.
- **Blood must be collected into a tube containing heparin.** Anticoagulants EDTA and citrate negatively affect results of the analysis.
- Blood samples should be treated within 24 hours after collection if stored at room temperature.

- **Stained samples should be analyzed within standardized time frame but no later than 2 hours after lysis.**
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Do not use reagents after expiration date stated on vial labels.
- Avoid DHR123 (ED7042-2) prolonged exposure to light.
- Avoid contamination of the reagent.
- Any non-performance of assay procedure may produce false results.
- Blood samples are considered as potentially infectious and must be handled with care.

**Warning:** The Lysing Solution (ED7042-4) contains formaldehyde and methanol.

Danger



#### H-phrases

H302+H312+H332: Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.

H317: May cause an allergic skin reaction.

H351: Suspected of causing cancer.

#### P-phrases

P270: Do not eat, drink or smoke when using this product.

P280: Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.

P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.

P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P501: Dispose of contents/container to authorized facility for dangerous wastes.

## 5. Reagents provided

- ED7042-1 **E.coli** – 5 vials containing lyophilized *E. coli* bacteria, 1 vial is intended for stimulation of 20 tubes.
- ED7042-2 **DHR123** – 5 vials containing lyophilized Dihydrorhodamine 123, 1 vial is intended for staining of 60 tubes.
- ED7042-3 **Stimulation Control** – 5 vials containing lyophilized PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), 1 vial is intended for stimulation of 20 positive controls.
- ED7042-4 **Lysing Solution** – 15 ml

## 6. Necessary material not supplied

- Suitable 5ml test tubes for blood staining (e.g. 12 × 75 mm)
- Ultrapure demineralized water
- Automatic pipettes with disposable tips
- Vortex mixer
- Thermostat able to incubate test tubes at 37 °C
- Flow cytometer - blue laser excitation at 488 nm, light emission at 525 nm (FITC)

## 7. Storage

Store the FagoFlowEx® Kit at 2-8 °C. Expiration date is stated on a vial labels and on the box.

## 8. Assay procedure

Use heparinized whole blood for examination (no later than 24 hours after collection). Prepare reagents according to following instructions.

#### Preparation of reagents before assay

1. Reconstitute lyophilized ***E. coli*** bacteria using 250 µl of demineralized water. Unused volume of the suspension store at 2-8 °C up to **24 hours**. Alternatively, the suspension can be aliquoted, frozen once, and stored at ≤ -20 °C for another use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
2. Reconstitute lyophilized **DHR123** using 650 µl of demineralized water and **shake gently - do not vortex**. Unused volume of the reagent store at 2-8 °C up to **8 hours**. Alternatively, the reagent can be aliquoted, frozen once, and stored at ≤ -20 °C for another use. Avoid repeated freeze/thaw cycles. Use frozen DHR123 solution within 14 days. Storage of frozen reagent **may cause a decrease of Stimulation Index** up to 20 %.
3. Reconstitute lyophilized **Stimulation Control** using 250 µl of demineralized water. Unused volume of the reagent store at 2-8 °C up to **24 hours**. Alternatively, the reagent can be aliquoted, frozen once, and stored at ≤ -20 °C for another use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
4. **Lysing Solution** is ready to use.

#### Assay procedure

For the examination of one blood sample prepare test tubes for **negative control, positive control** and for the **sample to be stimulated with *E. coli***.

1. Into the tubes destined for:
  - **stimulated sample:** add 10 µl of *E. coli* suspension,
  - **negative control sample:** add nothing,
  - **positive control sample:** add 10 µl of Stimulation Control.
2. Add 50 µl of heparinized whole blood into all tubes and vortex gently.
3. Add 10 µl of DHR123 into all tubes and vortex gently.
4. Incubate tubes at 37 °C for 20 minutes in water bath or 30 minutes in air incubator.
5. Add 50 µl of Lysing Solution into all tubes, vortex gently, and incubate for 5 minutes at room temperature.
6. Add 1 ml of demineralized water into all tubes, vortex gently, and incubate for 5-10 minutes at room temperature until the red blood cells are lysed.

The fluorescence of Rhodamine 123, produced by oxidation of DHR123, is detected in FITC channel (525 nm). Since the Rhodamine 123 is quickly released from granulocytes, samples need to be **measured as soon as possible** (no later than 2 hours after lysis) preferable in a **standardized narrow time frame**.

## 9. Flow cytometric analysis

Analyze stained samples using flow cytometer. Acquire at least 5,000 – 10,000 leukocytes per sample. Visualize measured data from stimulated and positive control and negative control

sample in the side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) dot-plot. Set the gate around granulocytes as shown in figure 1. Ingestion of bacteria influences the position of granulocytes in a SSC-FSC dot-plot. Due to this, it is recommended to set gates individually for each blood sample. Then bring the gated granulocytes to histograms as shown in figures 2a, 2b, 2c where the X-axis represents fluorescence intensity in FITC channel (FL1). Set appropriate gates to calculate the percentage of positive and negative granulocytes and their mean fluorescence intensity (MFI). Stimulated granulocytes which undergo the oxidative burst exhibit bright fluorescence of Rhodamine 123.

## 10. Interpretation of results

There are two parameters resulting from the assay that may indicate respiratory burst defects:

**a) Relative number of positive granulocytes** which exhibited respiratory burst after the *E. coli* stimulation.

**b) Stimulation index** means the MFI ratio of positive granulocytes of *E. coli* stimulated sample and negative granulocytes of negative control sample (see chapter 13). The stimulation index is used for approximate comparison of respiratory burst intensity between blood samples. Since the stimulation index may vary in different laboratories and instruments, each laboratory has to establish a normal range using its own test conditions.

## 11. Expected values

**Normal range** of respiratory burst activity of granulocytes has been determined in 50 peripheral blood samples of healthy adults.

Granulocytes with respiratory burst activity	90-100 %
Stimulation index of granulocytes	> 30

### Unusual results (potential defects of respiratory burst)

#### 1) Lower stimulation index

**a)** If granulocytes exhibit low respiratory burst after their stimulation with both *E. coli* and Stimulation Control (PMA), it can indicate suspicion of the most frequent defect - a **myeloperoxidase (MPO) deficiency**. The stimulation index is reduced approximately to 1/10 of normal value (Fig. 4).

**b)** Less frequently, if granulocytes exhibit none or low respiratory burst after their stimulation with both *E. coli* and Stimulation Control (PMA), it can indicate **chronic granulomatous disease (CGD)**. The intensity of the respiratory burst (Stimulation index) depends on the mutation of multiple enzymes of the NADPH oxidase cascade. If stimulated granulocytes of a female patient **exhibit two subpopulations** differing in the intensity of respiratory burst, it can indicate the defect in the X-linked gene. In this case, a part of granulocytes shows standard intensity, and the second part shows decreased intensity of respiratory burst (Fig. 5).

**c)** Rarely, **low activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)** producing NADPH may also cause low respiratory burst of granulocytes.

**2)** If the **positive control (stimulated by Stimulation Control) is positive and the tested sample (stimulated by *E. coli*) is negative**, the blood sample probably contains anticoagulant EDTA or citrate. Alternatively, it can indicate the patient defect in adhesion or ingestion process of phagocytosis.

**3) Low relative number of positive granulocytes** indicates that blood sample is older or improperly stored as higher percentage of damaged granulocytes accumulates over time.

**Detection of unusual results described above indicates the suspicion of disease only** which need to be confirmed by other tests. The MPO deficiency can be proved by intracellular staining of granulocytes using MAb to MPO (e.g. clone CLB-MPO-1/1, Cat. No. 1F-635-T100). Defects of NADPH oxidase (CGD) and G6PD must be confirmed by genetic analysis.

**Repeatability and reproducibility of the assay** was determined from the data measured by five operators on six blood samples in two parallels under the same experimental conditions. Using Analysis of variance the following parameters were calculated:

**a)** For relative number of positive granulocytes

CV <sub>repeatability</sub>	= 1.4 %
CV <sub>reproducibility</sub>	= 3.2 %

**b)** For determination of Stimulation index

CV <sub>repeatability</sub>	= 12.2 %
CV <sub>reproducibility</sub>	= 13.6 %

## 12. Limitations

- Reproducibility of the assay strongly depends on precise working (incubation times, temperature, pipetting).
- Flow cytometer may produce false results if the device has not been regularly calibrated and maintained appropriately.

## 1. Použití soupravy

FagoFlowEx® Kit je určený pro vyšetření **fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů** měřením respiračního (oxidačního) vzplanutí po jejich stimulaci bakteriemi *E. coli* v lidské periferní krvi s heparinem pomocí průtokové cytometrie.

## 2. Úvod

Pacienti s imunitním deficitem jsou v klinické praxi zachyceni na základě opakovaných infekcí. Příslušný typ infekčního agens bývá dobrým vodítkem k defektu určité složky imunitního systému. Deficity přirozené složky imunitního systému zahrnují především poruchy komplementu a fagocytózy a výrazně snižují naši schopnost odolávat infekcím, přestože adaptivní složka našeho imunitního systému zůstává nepostižena.

Nejčastějšími genetickými poruchami přirozené obranyschopnosti jsou vedle různých defektů migrace buněk poruchy fagocytární a zabíječské aktivity neutrofilních granulocytů, monocytů a makrofágů, které bývají způsobeny deficitem myeloperoxidázy (MPO) [1], chronickou granulomatózou (CGD) [2], nebo deficitem glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6PD) [3]. Všechny tyto nedostatky vedou k vážným chronickým infekcím specifických patogenů (bakterie, kvasinky a plísňe), které jsou odolné vůči standardní léčbě.

Respirační vzplanutí je narušeno u CGD, MPO a G6PD deficitů. Výsledkem těchto genetických poruch je snížení intenzity respiračního vzplanutí a proto fagocyty nejsou schopny účinně zničit intracelulární nebo pohlcené extracelulární patogeny.

Chronická granulomatóza (CGD) je klinicky a geneticky různorodá skupina dědičných onemocnění s deficitem ve více enzymech kaskády NADPH oxidázy vytvářející reaktivní kyslíkové radikály. Podstatou přibližně 1/3 pacientů s CGD je autozomálně recesivní mutace (*CYBA*, *NCF1*, *NCF2*) a dvě třetiny případů CGD vznikají na základě vad genu *CYBB* kódujícího gp91<sup>phox</sup> podjednotku flavocytochrome b<sub>558</sub>, který je lokalizován na chromozomu X [4, 5]. Aktivní NADPH oxidáza zdravého jedince katalyzuje reakci NADPH s kyslíkem a produkuje NADP<sup>+</sup> a superoxidový radikál O<sub>2</sub><sup>-</sup>, který prochází další řadou reakcí vedoucí k produkci singletového kyslíku a peroxidu vodíku, který je dále transformován myeloperoxidázou. Pacienti s CGD trpí zápallem plic, abscesy na kůži, tkáních a orgánech, hnisavou artritidou, osteomyelitidou, bacteremií / fungemií a povrchovými kožními infekcemi, jako je celulitida nebo impetigo [6]. Kromě toho může přetrvávající infekce vést k tvorbě tkáňových granulomů na základě přílišné produkce TNF a IFN $\gamma$  cytokinů CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. Důležité je, že pacienti s CGD trpí nejen opakujícími se infekcemi, ale též nadměrnými zánětlivými neinfekčními stavy [7].

Deficit MPO je genetická porucha, která má za následek kvantitativní nebo funkční nedostatek následného generování hydroxylových radikálů a chlomanu z peroxidu vodíku enzymem myeloperoxidázou. Chloman je považován za hlavní zabíječ patogenů při respiračním vzplanutí [8].

Enzym G6PD se účastní dráhy hexóza monofosfátu, tedy jednoho z hlavních procesů tvorby NADPH. Snižená aktivita G6PD je spojena s chronickou nesférocytickou hemolytickou anémií, ale může též způsobovat snížení respiračního vzplanutí fagocytů, pokud aktivita tohoto enzymu vlivem mutace poklesne

přibližně pod 5 % normální aktivity [9]. V tomto případě jsou příznaky onemocnění podobné s CGD.

Všechny výše uvedené nemoci spojené s fagocytární funkcí ilustrují důležitou roli fagocytů při odstraňování a usmrcování patogenů pro udržení homeostázy našich těl.

## 3. Princip

Princip testu je založen na měření respiračního vzplanutí neutrofilních granulocytů po jejich stimulaci inaktivovanými bakteriemi *E. coli*. Při procesu ingesce bakterií je ve fagocytech aktivována NADPH-oxidáza, která spustí respirační vzplanutí. Vznikající chlornan uvnitř fagocytů silně oxiduje dihydrorhodamin 123 (DHR123) na fluorescenční produkt rhodamin 123, který je detekován průtokovým cytometrem. V případě defektu myeloperoxidázy, kdy nevzniká chlornan jako terminální produkt respiračního vzplanutí, je dihydrorhodamin 123 oxidován v menší míře ostatními reaktivními meziproducty respiračního vzplanutí, což se projeví sníženou intenzitou fluorescence stimulovaných granulocytů. Pozitivní kontrolu představuje vzorek, který je inkubován s PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), který spustí respirační vzplanutí i bez adheze a ingesce patogenu granulocytem.

## 4. Upozornění

- Souprava je určena pro In vitro diagnostiku a vyhovuje požadavkům NV 56/2015 Sb., které je harmonizováno s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.
- **Krev musí být odebrána do zkumavky s heparinem.** Antikoagulanty EDTA a citrát ruší analýzu.
- Vzorky krve zpracujte nejdříve do 24 hodin po odběru, přičemž krev v odběrových zkumavkách musí být skladována za laboratorní teploty na kývačce.
- **Vzorky analyzujte nejpozději 2 hodiny po lyzi ve standardizovaném časovém rámci.**
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nepoužívejte reagentie po uplynutí doby použitelnosti.
- Reagentii DHR123 (ED7042-2) nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Nedodržení doporučeného postupu analýzy může ovlivnit výsledky testů.
- Pracujte výhradně v ochranných rukavicích a při práci dodržujte správné postupy pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem.

**Varování:** reagentie Lysing Solution (ED7042-4) obsahuje formaldehyd a metanol.

Nebezpečí



### H-věty

H302+H312+H332: Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží a při vdechování.

H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci.

H351: Podezření na vyvolání rakoviny.

## P-věty

P270: Při používání tohoto výrobku nejzte, nepijte ani nekuřte.

P280: Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

P301+312: PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302+352: PŘI STYKU S KÚŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdlem.

P305+351+338: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P501: Odstraňte obsah/obal v autorizovaném místě sběru nebezpečných odpadů.

## 5. Obsah soupravy

- ED7042-1 E.coli – 5 kusů vialek obsahujících lyofilizované bakterie *E. coli*, jedna vialka je určená pro stimulaci 20 zkumavek.
- ED7042-2 DHR123 – 5 kusů vialek obsahujících lyofilizovaný dihydrorhodamin 123, jedna vialka je určená pro obarvení 60 zkumavek.
- ED7042-3 Stimulation Control – 5 kusů vialek obsahujících lyofilizovaný PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), jedna vialka je určená pro stimulaci 20 pozitivních kontrolních vzorků.
- ED7042-4 Lysing Solution – lahvička s lyzačním roztokem, 15 ml.

## 6. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

- Vhodné 5ml zkumavky pro barvení buněk (např. 12 x 75 mm)
- Ultračistá demineralizovaná voda
- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Termostat umožňující inkubovat zkumavky při 37 °C
- Průtokový cytometr - excitační modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC)

## 7. Skladování soupravy

FagoFlowEx® Kit skladujte při teplotě 2-8 °C. Doba použitelnosti je vyznačena na jednotlivých reagentech i na krabici soupravy.

## 8. Postup testu

Vyšetření se provádí na krvi odebrané do zkumavky s heparinem do 24 hod od odběru. Reagencie připravte podle následujících instrukcí.

### Příprava reagentů před měřením

1. Lyofilizované bakterie *E. coli* před použitím rekonstituujte pomocí 250 µl demineralizované vody a suspenzi promíchejte vortexem. Nespotebované množství suspenze je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle **24 hodin**, případně zamrazit při ≤ -20 °C po vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.

2. Lyofilizovaný **DHR123** před použitím rekonstituujte pomocí 650 µl demineralizované vody. Roztok **mírně promíchejte**, intenzivní míchání vortexem zrychluje nežádoucí oxidaci. Nespotebované množství roztoku je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle **8 hodin**, případně zamrazit při ≤ -20 °C po vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku. Zamražený roztok DHR123 spotřebujte do 14 dnů. Skladování zamraženého roztoku **může způsobit až 20% pokles stimulačních indexů**.
3. Lyofilizovanou reagentii **Stimulation Control** před použitím rekonstituujte pomocí 250 µl demineralizované vody a roztok promíchejte vortexem. Nespotebované množství roztoku je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle **24 hodin**, případně zamrazit při ≤ -20 °C po vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.
4. Lyzační roztok (**Lysing Solution**) je připraven pro okamžité použití.

### Postup testu

Pro vyšetření jednoho vzorku krve je třeba připravit **negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a vzorek stimulovaný suspenzí E. coli**.

1. Do zkumavek určených pro:
  - **vzorek stimulovaný bakteriemi:** napipetujte 10 µl suspenze *E. coli*,
  - **negativní kontrolní vzorek:** nepipetujte nic,
  - **pozitivní kontrolní vzorek:** napipetujte 10 µl roztoku Stimulation Control (PMA).
2. Do všech zkumavek napipetujte 50 µl krve s heparinem a zkumavky promíchejte pomocí vortexu.
3. Do všech zkumavek napipetujte 10 µl rekonstituovaného roztoku DHR123 a zkumavky promíchejte pomocí vortexu.
4. Zkumavky inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 20 minut ve vodní lázni nebo 30 minut v inkubátoru.
5. Poté přidejte 50 µl lyzačního roztoku (Lysing Solution), zkumavky promíchejte pomocí vortexu a inkubujte 5 minut při laboratorní teplotě.
6. Do zkumavek přidejte 1 ml demineralizované vody, promíchejte pomocí vortexu a inkubujte přibližně 5-10 minut při laboratorní teplotě, dokud nedojde k lyzi červených krvinek.

Fluorescence rhodaminu 123, který vzniká oxidací DHR123, je detekována v kanále pro FITC (525 nm). Jelikož rhodamin 123 je z granulocytů poměrně rychle vyplavován, je třeba vzorky **co nejdříve změřit** cytometrem (do 2 hodin od lyze), **v úzkém časovém rámci**. Důležité je nastavit standardní čas od lyze (bod 6) do změření vzorků, který bude v laboratoři stále používán.

## 9. Analýza průtokovým cytometrem

Obarvené vzorky analyzujte průtokovým cytometrem, přičemž změřte minimálně 5000-10000 leukocytů od každého vzorku. Naměřená data stimulovaného vzorku a pozitivní a negativní kontroly zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Ohraničte populace granulocytů, jak je znázorněno na obrázku 1. Vlivem ingescence bakterií dochází k posunu populace granulocytů v grafu SSC-FCS. Regiony (gate) je proto třeba nastavit jednotlivě u každého vzorku. Poté zobrazte ohraničené granulocyty v histogramech, jak je uvedeno na obrázcích 2a, 2b, 2c, kde na vodorovné ose je vynesena intenzita fluorescence v kanálu pro FITC (FL1). Vhodně umístěnými regiony (gate) spočítejte procentuelní

zastoupení pozitivních a negativních granulocytů a jejich průměrnou intenzitu fluorescence (MFI). Stimulované granulocyty, u kterých došlo k respiračnímu vzplanutí, vykazují intenzivní fluorescenci rhodaminu 123 v kanálu pro FITC.

## 10. Vyhodnocení testu

Z naměřených dat jsou vyhodnocovány dva parametry, které mohou indikovat podezření na poruchu respiračního vzplanutí:

**a) Procentuelní zastoupení pozitivních granulocytů**, které vykazují respirační vzplanutí po stimulaci bakteriemi *E. coli*.

**b) Stimulační index**, který představuje poměr MFI pozitivních granulocytů stimulovaného vzorku a MFI negativních granulocytů negativního kontrolního vzorku (viz kap. 13). Stimulační index slouží pro přibližné porovnání intenzity respiračního vzplanutí mezi jednotlivými vzorky krve. Stimulační index je ovlivněn experimentálními podmínkami v laboratoři a nastavením průtokového cytometru. Každá laboratoř si proto musí ustanovit vlastní rozsah normálních hodnot stimulačních indexů.

## 11. Očekávané hodnoty

**Normální hodnoty** fagocytární aktivity granulocytů byly stanoveny na čerstvých vzorcích periferní krve 50 zdravých jedinců.

Počet granulocytů s respiračním vzplanutím	90-100 %
Stimulační index granulocytů	> 30

### Nestandardní hodnoty (potenciální defekty respiračního vzplanutí)

#### 1) Nízký stimulační index

**a)** Pokud stimulované granulocyty vykazují sníženou intenzitu respiračního vzplanutí, může být příčinou **nepřítomnost funkčního enzymu myeloperoxidázy (MPO)** ve fagocytech. Porucha se projevuje poklesem stimulačního indexu přibližně na 1/10 normálních hodnot (Obr. 4).

**b)** Méně častou příčinou poruchy, která se projevuje sníženým nebo žádným respiračním vzplanutím stimulovaných granulocytů, je závažné onemocnění **chronická granulomatóza (CGD)** spojené s poruchou kaskády NADPH oxidázy. Intenzita snížení stimulačního indexu u této poruchy závisí na povaze mutace. Pokud stimulované granulocyty vykazují **dvě oddělené subpopulace** lišící se intenzitou respiračního vzplanutí, může se jednat o vzorek přenašečky chronické granulomatózy (CGD), která má část granulocytů s normální intenzitou respiračního vzplanutí a část granulocytů s intenzitou sníženou podle povahy mutace na chromozomu X (Obr. 5).

**c)** Sníženou intenzitou respiračního vzplanutí může vzácně způsobit i snížená **aktivita enzymu G6PD**, který je důležitý pro tvorbu NADPH.

**2)** V případě, kdy **granulocyty nejsou stimulovány pomocí bakterií *E. coli*, ale jsou stimulovány pomocí stimulantu pozitivní kontroly (PMA)**, byl vzorek krve pravděpodobně odebrán do zkumavky s EDTA nebo citrátem. Pokud je tento jev potvrzen i při opakovaném odběru krve (do zkumavky s heparinem), může indikovat podezření na poruchu ingesce patogenů fagocyty.

**3) Nízké relativní zastoupení pozitivních granulocytů** indikuje podezření, že analyzovaný vzorek krve byl starší, než je doporučeno, případně byl skladován za nevhodných podmínek.

**Záchyty výše popsaných nestandardních hodnot indikují pouze podezření** na výše uvedené poruchy respiračního vzplanutí,  **které je třeba potvrdit jiným testem.** Defekt MPO lze prokázat např. pomocí intracelulárního barvení MPO v granulocytech značenou protilátkou (např. klon CLB-MPO-1/1, kat. č. 1F-635-T100). Defekty NADPH oxidázy a G6PD lze prokázat genetickým vyšetřením na specializovaném pracovišti.

**Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření** byla stanovena duplicitním měřením 6 vzorků krve nezávisle pěti operátory za stejných experimentálních podmínek. Metodou analýzy rozptylů byly stanoveny následující parametry opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření:

**a) Pro stanovení počtu stimulovaných granulocytů**

CV <sub>opakovatelnost</sub>	= 1,4 %
CV <sub>reprodukovatelnost</sub>	= 3,2 %

**b) Pro stanovení stimulačního indexu granulocytů**

CV <sub>opakovatelnost</sub>	= 12,2 %
CV <sub>reprodukovatelnost</sub>	= 13,6 %

## 12. Omezení metody

- Opakovatelnost i reprodukovatelnost měření stimulačního indexu je silně závislá na dodržování inkubačních časů, inkubační teploty a na preciznosti pipetování.
- Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není pravidelně kalibrován a udržován.

## 1. Použitie súpravy

FagoFlowEx® Kit je určený na vyšetrenie **fagocytárnej aktivity neutrofilných granulocytov** analýzou ich respiračného (oxidatívneho) vzplanutia po stimulácii baktériami *E. coli* v ľudskej periférnej krvi s heparínom pomocou prietokovej cytometrie.

## 2. Úvod

Pacienti s deficitom imunity sú v klinickej praxi zachytávaní na základe opakovaných infekcií. Príslušný typ infekčného agens môže smerovať k defektu určitej zložky imunitného systému. Deficity prirodzenej zložky imunitného systému zahŕňajú predovšetkým poruchy komplementu a fagocytózy a výrazne znižujú našu schopnosť odolávať infekciám, aj napriek tomu, že adaptívna zložka nášho imunitného systému zostáva nepostihnutá.

Najčastejšími genetickými poruchami prirodzenej obranyschopnosti sú rôzne defekty migrácie buniek, poruchy fagocytárnej a ničivej aktivity neutrofilných granulocytov, monocytov a makrofágov, ktoré sú založené na deficite myeloperoxidázy (MPO) [1], chronická granulomatóza (CGD) [2] a deficit glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6PD) [3]. Všetky tieto nedostatky vedú k vážnym chronickým infekciám špecifických patogénov (baktérie, kvasinky a plesne), ktoré sú odolné voči bežnej liečbe.

Respiračné vzplanutie je pri CGD, MPO a G6PD deficitoch narušené. Výsledkom týchto genetických porúch je zníženie intenzity respiračného vzplanutia čo má za následok neschopnosť fagocytov účinne zničiť intracelulárne alebo pohltené extracelulárne patogény.

Chronická granulomatóza (CGD) je klinicky a geneticky rôznorodá skupina dedičných chorôb s funkčným deficitom u viacerých enzýmov kaskády NADPH oxidázy vytvárajúcich reaktívne kyslíkové radikály. Podstatou u približne 1/3 CGD pacientov je autozomálne recesívna mutácia (*CYBA*, *NCF1*, *NCF2*) a u dvoch tretín CGD pozitívnych prípadov vznikajú na základe porúch v X-viazanom *CYBB* géne kódujúceho gp91<sup>phox</sup> podjednotku flavocytochrome b<sub>558</sub> [4, 5]. Aktívna NADPH oxidáza zdravého jedinca katalyzuje reakciu NADPH s kyslíkom a produkuje NADP<sup>+</sup> a superoxidový radikál O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ktorý prechádza kaskádou reakcií vedúcich k produkcii singletového kyslíka a peroxidu vodíka, ktorý je ďalej transformovaný myeloperoxidázou. CGD pacienti trpia zápalom pľúc, abscesmi na koži, tkanivách a orgánoch, hnisavou artritídou, osteomyelitídou, baktériami / fungémiou a povrchovými kožnými infekciami, ako je celulitída alebo impetigo [6]. Okrem toho môže pretrvávajúca infekcia viesť k tvorbe tkanivových granulómov na základe prílišnej produkcie TNF a IFN $\gamma$  cytokínov CD4<sup>+</sup> T bunkami. Dôležité je, že CGD pacienti trpia nielen opakujúcimi sa infekciami, ale tiež nadmernými zápalovými neinfekčnými stavmi [7].

Deficit MPO je genetická porucha, ktorá má za následok kvantitatívny alebo funkčný nedostatok následného generovania hydroxylových radikálov a chlórnanu z peroxidu vodíka enzýmom myeloperoxidáza. Chlórnan je považovaný za hlavný spôsob ničenia patogénov pri respiračnom vzplanutí [8].

G6PD enzým je súčasťou dráhy hexóza monofosfátu – čo je jeden z hlavných procesov tvorby NADPH. Znížená aktivita G6PD enzýmu je spojená s chronickou nesférocytickou

hemolytickou anémiou, rovnako tak môže byť spojená so znížením respiračného vzplanutia fagocytov, ak aktivita G6PD vplyvom mutácie klesne približne pod 5 % normálnej aktivity [9]. V tomto prípade sú príznaky choroby podobné s CGD.

Všetky vyššie uvedené choroby spojené s fagocytárnou funkciou ilustrujú jej dôležitú úlohu pri odstraňovaní a zabíjaní patogénov pre udržanie homeostázy v ľudskom tele.

## 3. Princíp

Test je založený na meraní respiračného vzplanutia neutrofilných granulocytov po ich stimulácii inaktivovanými baktériami *E. coli*. Pri procese ingestie baktérií je vo fagocytoch aktivovaná NADPH-oxidáza, ktorá spustí respiračné (oxidatívne) vzplanutie. Chlórnan vznikajúci vo vnútri fagolyzozómu silne oxiduje dihydrorhodamin 123 (DHR123) vo vnútri fagocytov na fluorescenčný produkt rhodamin 123, ktorý je detekovaný prietokovým cytometrom. V prípade defektu myeloperoxidázy, kedy nevzniká chlórnan ako terminálny produkt respiračného vzplanutia, je dihydrorhodamin 123 oxidovaný v menšej miere inými reaktívnymi medziproduktmi respiračného vzplanutia, čo sa prejaví zníženou intenzitou fluorescencie stimulovaných granulocytov. Pozitívnu kontrolu predstavuje vzorka, ktorá je inkubovaná s PMA (phorbol 12-myristát 13-acetát), ktorý spustí respiračné vzplanutie aj bez adhézie a ingestie patogénu granulocytom.

## 4. Upozornenie

- Súprava je určená pre In vitro diagnostiku a vyhovuje požiadavkám európskej smernice pre In vitro diagnostické zdravotnícke prostriedky 98/79/EC.
- Krv musí byť odobratá do skúmavky s heparínom.** Antikoagulanty EDTA a citrát rušia stanovenie.
- Vzorky krvi spracujte najneskôr do 24 hodín od odberu, pričom krv v odberových skúmavkách musí byť skladovaná pri laboratórnej teplote na kývačke.
- Vzorky analyzujte najneskôr do 2 hodín od lýzy v štandardizovanom časovom rámci.**
- Prietokový cytometer pravidelne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľičiek, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.
- Nepoužívajte reagentie po uplynutí doby použiteľnosti.
- Reagenciu DHR123 (ED7035-2) nevystavujte dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Chráňte obsah vialok pred kontamináciou.
- Nedodržanie odporúčaného postupu analýzy môže ovplyvniť výsledky testov.
- Pracujte výhradne v ochranných rukaviciach a pri práci dodržujte správne postupy zaobchádzania s potenciálne infekčným materiálom.

**Varovanie:** reagentia Lysing Solution (ED7042-4) obsahuje formaldehyd a metanol.

Nebezpečenstvo



### H-vety

H302+H312+H332: Zdraviu škodlivý pri požití, pri kontakte s pokožkou a pri vdýchnutí.

H317: Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.

H351: Podozrenie na vyvolanie rakoviny.

#### P-vety

P270: Pri používaní výrobku nejedzte, nepite ani nefajčite.

P280: Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.

P301+312: PO POŽITÍ: Pri zdravotných problémoch volajte Národné toxikologické informačné centrum alebo lekára.

P302+352: PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla.

P305+351+338: PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P501: Zneškodnite obsah/nádobu v autorizovanom mieste zberu nebezpečných odpadov.

## 5. Obsah súpravy

- **ED7042-1 E.coli** – 5 kusov fľaštičiek obsahujúcich lyofilizované baktérie *E. coli*, jedna fľaštička je určená na stimuláciu 20 skúmaviek.
- **ED7042-2 DHR123** – 5 kusov fľaštičiek obsahujúcich lyofilizovaný dihydrorhodamin 123, jedna fľaštička je určená na označenie 60 skúmaviek.
- **ED7042-3 Stimulation Control** – 5 kusov fľaštičiek obsahujúcich lyofilizovaný PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), jedna fľaštička je určená na stimuláciu 20 pozitívnych kontrolných vzoriek.
- **ED7042-4 Lysing Solution** – fľaštička s lyzačným roztokom, 15 ml

## 6. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý sa nedodáva

- Vhodné 5ml skúmavky na farbenie buniek (napr. 12 × 75 mm)
- Ultračistá demineralizovaná voda
- Sada automatických pipiet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Termostat umožňujúci inkubovať skúmavky pri 37 °C
- Prietokový cytometer - excitácia modrým laserom 488 nm, emisia žiarenia pri 525 nm (FITC)

## 7. Skladovanie súpravy

FagoFlowEx® Kit skladujte pri teplote 2-8 °C. Doba použiteľnosti je vyznačená na jednotlivých reagenčiach a na krabici súpravy.

## 8. Postup testu

Vyšetruje sa v plnej krvi odoberatej do skúmavky s heparínom do 24 hod od odberu. Reagenzie pripravte podľa nasledujúceho postupu.

### Príprava reagenčí pred analýzou

1. Lyofilizované baktérie ***E. coli*** pred použitím rozpustite pomocou 250 µl demineralizovanej vody a suspenziu premiešajte vortexom. Nevyužitú suspenziu je možné skladovať v chladničke (2-8 °C) po dobu **24 hodín**, poprípade zamraziť pri ≤ -20 °C vo vhodných alikvotných množstvách na ďalšie použitie. Vyvarujte sa opakovanému zamrazovaniu a rozmrazovaniu roztoku.
2. Lyofilizovaný **DHR123** pred použitím rozpustite v 650 µl demineralizovanej vody. Roztok **jemne premiešajte**,

intenzívne miešanie vortexom urýchľuje nežiaducu oxidáciu. Nevyužitú množstvo roztoku je možné skladovať v chladničke (2-8 °C) po dobu **8 hodín**, poprípade zamraziť pri ≤ -20 °C vo vhodných alikvotných množstvách na ďalšie použitie. Vyvarujte sa opakovanému zamrazovaniu a rozmrazovaniu roztoku. Zmrazený roztok DHR123 spotrebujte do 14 dní. Skladovanie zmrazeného roztoku **môže spôsobiť až 20% pokles u stimulačných indexov**.

3. Lyofilizovaný **Stimulation Control** pred použitím rozpustite v 250 µl demineralizovanej vody a roztok premiešajte vortexom. Nevyužitú množstvo roztoku je možné skladovať v chladničke (2-8 °C) po dobu **24 hodín**, poprípade zamraziť pri ≤ -20 °C vo vhodných alikvotných množstvách na ďalšie použitie. Vyvarujte sa opakovanému zamrazovaniu a rozmrazovaniu roztoku.
4. Lyzačný roztok (**Lysing Solution**) je pripravený na okamžité použitie.

### Postup testu

Na vyšetrenie jednej vzorky krvi je nutné pripraviť **negatívnu kontrolu, pozitívnu kontrolu a vzorku stimulovanú suspenziou *E. coli***. Označené vzorky je možné lyzovať postupom spojeným s alebo bez **premytia vzorky**.

1. Do skúmaviek určených pre:
  - **vzorku stimulovanú baktériami:** napipetujte 10 µl suspenzie *E. coli*,
  - **negatívnu kontrolnú vzorku:** nepipetujte nič,
  - **pozitívnu kontrolnú vzorku:** napipetujte 10 µl roztoku Stimulation Control (PMA).
2. Do všetkých skúmaviek napipetujte 50 µl krvi s heparínom a skúmavky premiešajte pomocou vortexu.
3. Do všetkých skúmaviek napipetujte 10 µl rozpusteného roztoku DHR123 a skúmavky premiešajte pomocou vortexu.
4. Skúmavky inkubujte pri teplote 37°C po dobu 20 minút vo vodnom kúpeli alebo 30 minút v inkubátore.
5. Potom pridajte 50 µl lyzačného roztoku (Lysing Solution), skúmavky premiešajte pomocou vortexu a inkubujte 5 minút pri laboratórnej teplote.
6. Do skúmaviek pridajte 1 ml demineralizovanej vody, premiešajte pomocou vortexu a inkubujte približne 5-10 minút pri laboratórnej teplote, kým nedôjde k lýze červených krviniek.

Fluorescencia rhodaminu 123, ktorý vzniká oxidáciou DHR123, je detekovaná v kanále pre FITC (525 nm). Vzhľadom k tomu, že rhodamin 123 je z granulocytov pomerne rýchlo vyplavovaný (viď Obr. 4), je nutné vzorky čo **najskôr analyzovať** cytometrom (do 2 hodín od lýzy), najlepšie **v úzkom časovom rozmedzí**. Je dôležité štandardizovať si čas od lýzy do času zmerania vzorky.

## 9. Analýza prietokovým cytometrom

Označené vzorky zmerajte prietokovým cytometrom. Analyzujte minimálne 5.000-10.000 udalostí z každej vzorky. Namerané dáta stimulovanej vzorky a pozitívnej a negatívnej kontroly vynesť do grafu side-scatter (SSC) proti forward-scatter (FSC). Ohraničte populáciu granulocytov, ako je to znázornené na obrázku 1. Vplyvom fagocytácie baktérií dochádza k posunu populácie granulocytov v FSC-SSC grafe. Regióny (gate) je preto nutné nastaviť jednotlivito pri každej vzorke. Potom zobrazte ohraničené granulocyty v histograme ako je uvedené na obrázkoch 2a, 2b, 2c, kde je na osi X vynesená intenzita fluorescence v kanále pre FITC (FL1). Pomocou vhodne



umiestnených regiónov (gate) spočítajte percentuálne zastúpenie pozitívnych a negatívnych granulocytov a ich priemernú intenzitu fluorescencie (MFI). Stimulované granulocyty, u ktorých došlo k respiračnému vzplanutiu, vykazujú intenzívnu fluorescenciu rhodaminu 123 v kanále pre FITC.

## 10. Vyhodnotenie testu

Z nameraných dát sú vyhodnocované dva parametre, ktoré môžu indikovať podozrenie na poruchu respiračného vzplanutia:

- a) **Percentuálne zastúpenie pozitívnych granulocytov**, ktoré vykazujú respiračné vzplanutie po stimulácii baktériami *E. coli*.
- b) **Stimulačný index**, ktorý predstavuje pomer MFI pozitívnych granulocytov stimulovanej vzorky a MFI negatívnych granulocytov negatívnej kontrolnej vzorky (viď kap. 13). Stimulačný index slúži pre približné porovnanie intenzity respiračného vzplanutia medzi jednotlivými vzorkami krvi. Stimulačný index je ovplyvnený experimentálnymi podmienkami v laboratóriu a nastavením prietokového cytometru. Každé laboratórium si preto musí stanoviť vlastný rozsah normálnych hodnôt stimulačných indexov.

## 11. Očakávané hodnoty

**Normálne hodnoty** fagocytárnej aktivity granulocytov boli stanovené na čerstvých vzorkách periférnej krvi 50 zdravých jedincov.

Počet granulocytov s respiračným vzplanutím	90-100 %
Stimulačný index granulocytov	> 30

### **Neštandardné hodnoty (potenciálne defekty respiračného vzplanutia)**

#### 1) Nízky stimulačný index

a) V prípade, že stimulované granulocyty vykazujú zníženú intenzitu respiračného vzplanutia, príčinou môže byť **absencia enzýmu myeloperoxidáza (MPO)** vo fagocytoch. Porucha sa prejavuje poklesom stimulačného indexu na približne 1/10 normálnej hodnoty (Obr. 4).

b) Menej častou príčinou poruchy, ktorá sa prejavuje zníženým alebo žiadnym respiračným vzplanutím stimulovaných granulocytov, je závažná choroba **chronická granulomatóza (CGD)** spojená s poruchou kaskády NADPH oxidázy. Úroveň zníženia stimulačného indexu u tejto poruchy závisí od povahy mutácie. Ak stimulované granulocyty vykazujú **dve oddelené subpopulácie** líšiace sa intenzitou respiračného vzplanutia, môže sa jednať o vzorku prenášačky chronickej granulomatózy (CGD), ktorá má časť granulocytov s normálnou intenzitou respiračného vzplanutia a časť granulocytov so zníženou intenzitou respiračného vzplanutia podľa povahy mutácie na chromozóme X (Obr. 5).

c) Zníženú intenzitu respiračného vzplanutia môže vo vzácnom prípade spôsobiť aj znížená **aktivita G6PD enzýmu**, ktorý tvorí NADPH.

2) V prípade, keď **granulocyty nie sú stimulované baktériami *E. coli*, ale sú stimulované pomocou Stimulation Control (PMA)**, bola vzorka krvi pravdepodobne odobratá do skúmavky s EDTA alebo s citrátom. V prípade, že je tento jav potvrdený aj pri opakovanom odbere krvi (do skúmavky s heparínom), môže

to indikovať podozrenie na poruchu ingescie patogénov fagocyty.

3) **Nízke relatívne zastúpenie pozitívnych granulocytov** indikuje podozrenie na to, že analyzovaná vzorka krvi bola staršia, než je odporúčané, prípadne bola skladovaná pri nevhodných podmienkach.

**Záchyty vyššie popísaných neštandardných hodnôt indikujú iba podozrenie** na vyššie uvedené poruchy respiračného vzplanutia, **ktoré je nutné potvrdiť ďalším testom**. Defekt MPO je možné potvrdiť napr. pomocou intracelulárneho značenia MPO v granulocytoch fluorescenčne značenou protilátkou (napr. klon CLB-MPO-1/1, kat. č. 1F-635-T100). Defekty NADPH oxidázy a G6PD je možné potvrdiť genetickým vyšetrením na špecializovanom pracovisku.

**Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť merania** bola stanovená duplicitným meraním 6 vzoriek krvi nezávisle piatimi operátormi pri rovnakých experimentálnych podmienkach. Metódou analýzy rozptylov boli stanovené nasledujúce parametre opakovateľnosti a reprodukovateľnosti merania:

a) Pre stanovenie počtu stimulovaných granulocytov

$$CV_{\text{opakovateľnosť}} = 1,4 \%$$
$$CV_{\text{reprodukovateľnosť}} = 3,2 \%$$

b) Pre stanovenie stimulačného indexu granulocytov

$$CV_{\text{opakovateľnosť}} = 12,2 \%$$
$$CV_{\text{reprodukovateľnosť}} = 13,6 \%$$

## 12. Obmedzenia metódy

- Reprodukovateľnosť meraní stimulačného indexu je silne závislá od dodržiavania inkubačných časov, inkubačnej teploty a od precíznosti pipetovania.
- Prietokový cytometer môže poskytovať nepresné hodnoty, ak nie je pravidelne kalibrovaný a udržiavaný.

13. Example of data analysis / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

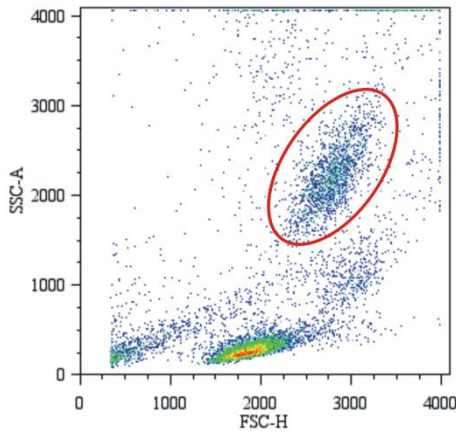


Fig. 1 Delimitation of granulocyte population.  
 Obr. 1 Ohraničení populace granulocytů.  
 Obr. 1 Ohraničenie populácie granulocytov.

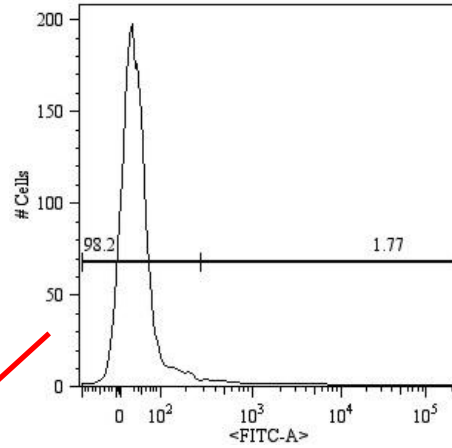


Fig. 2a Histogram of negative control granulocytes.  
 Obr. 2a Histogram populace granulocytů negativní kontroly.  
 Obr. 2a Histogram populácie granulocytov negatívnej kontroly.

Nonstimulated granulocytes (negative control)

Population	Number (%)	FL1 mean
negative	98.2	33.3
positive	1.77	751

Stimulated granulocytes

Population	Number (%)	FL1 mean
negative	0.56	130
positive	99.4	3391

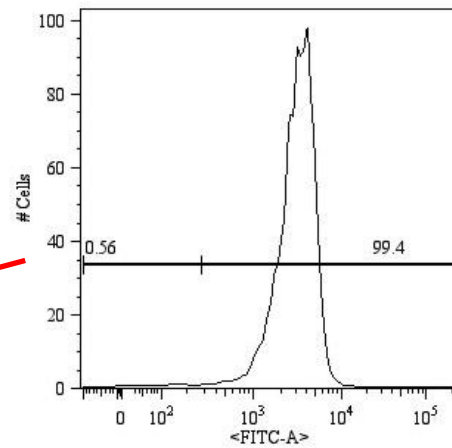


Fig. 2b Histogram of stimulated granulocytes.  
 Obr. 2b Histogram populace stimulovaných granulocytů.  
 Obr. 2b Histogram populácie stimulovaných granulocytov.

Calculation:

Stimulation index = 3391 / 33.3 = 102

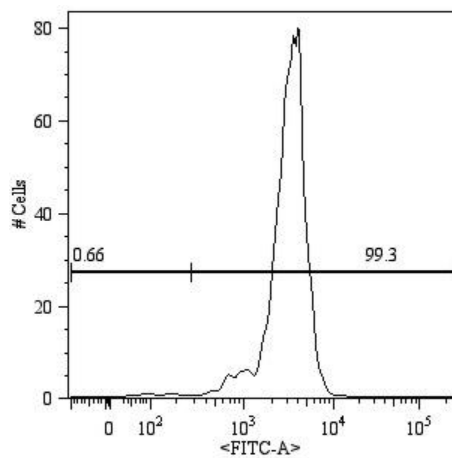
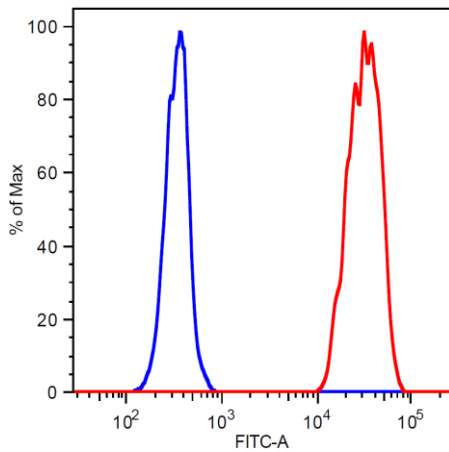
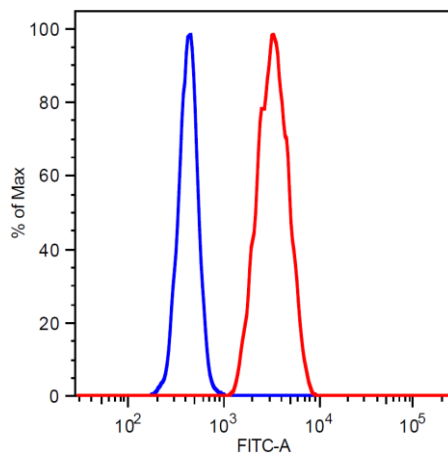


Fig. 2c Histogram of positive control granulocytes.  
 Obr. 2c Histogram populace granulocytů pozitivní kontroly.  
 Obr. 2c Histogram populácie granulocytov pozitívnej kontroly.

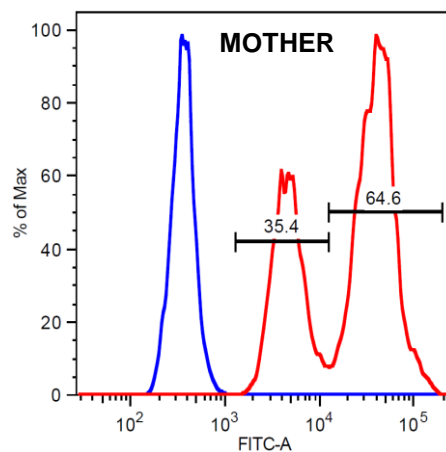
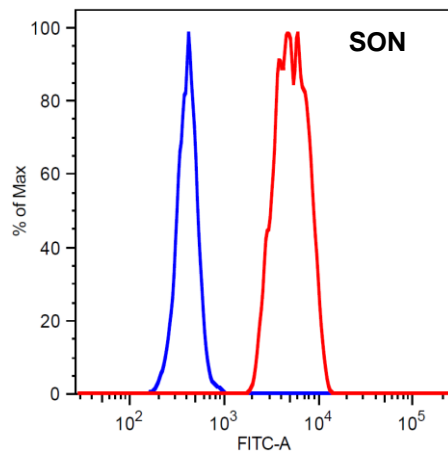
#### 14. Example of respiratory burst defects / Příklady poruch respiračního vzplanutí / Příklady poruch respiračného vzplanutia



**Fig. 3** Donor without defect of respiratory burst (SI = 98).  
**Obr. 3** Dárce bez poruchy respiračního vzplanutí (SI = 98).  
**Obr. 3** Darca bez poruchy respiračného vzplanutia (SI = 98).



**Fig. 4** Patient with myeloperoxidase deficiency (SI = 8.2).  
**Obr. 4** Pacient s defektem myeloperoxidázy (SI = 8,2).  
**Obr. 4** Pacient s defektom myeloperoxidázy (SI = 8,2).



**Fig. 5** Male patient (left figure) with chronic granulomatous disease and her mother (right figure) carrying the X-linked mutation of the NADPH oxidase. Male patient had SI = 13.6. Mother had two granulocyte subpopulations differing in respiratory burst intensity:  $SI^{low} = 13,9$ ,  $SI^{high} = 125$ .

**Obr. 5** Pacient-muž (levý obrázek) s chronickou granulomatózou a jeho matka (pravý obrázek) přenašečka mutace NADPH oxidázy na chromozomu X. Syn měl SI = 13,6. Matka měla dvě subpopulace granulocytů lišící se v intenzitě respiračního vzplanutí:  $SI^{low} = 13,9$ ,  $SI^{high} = 125$ .

**Obr. 5** Pacient-muž (ľavý obrázok) s chronickou granulomatózou a jeho matka (pravý obrázok) prenášačka mutácie NADPH oxidázy na chromozóme X. Syn mal SI = 13,6. Matka mala dve subpopulácie granulocytov lišiace sa intenzitou respiračného vzplanutia:  $SI^{low} = 13,9$ ,  $SI^{high} = 125$ .

#### **Explanation:**

**SI** – Stimulation index








**Blue line** – Negative control granulocytes

**Red line** – Granulocytes stimulated using *E. coli* bacteria

## 15. References / Literatura / Literatúra

- 1) <http://omim.org/entry/254600>
- 2) <http://omim.org/entry/306400>
- 3) <http://omim.org/entry/305900>
- 4) Dinauer, M. C. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 89–95 (2005).doi:10.1182/asheducation-2005.1.89.
- 5) de Oliveira-Junior, E. B., Bustamante, J., Newburger, P. E. & Condino-Neto, A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand. J. Immunol.* 73, 420–427 (2011).
- 6) Song, E. et al. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *Clin Mol Allergy* 9, 10 (2011).
- 7) Kuijpers, T. & Lutter, R. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 7–15 (2012).
- 8) Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598–625 (2005).
- 9) van Bruggen, R. et al. Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 100, 1026–1030 (2002).

## 16. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

 IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device In vitro diagnostický zdravotnický prostředek In vitro diagnostický zdravotnícky prostriedok
 REF	Catalog number Katalógové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
	Consult the manual before use Viz návod k použití Viď návod na použitie
	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplôt Rozmedzie skladovacích teplôt
 LOT	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do

## 17. Manufacturer / Výrobce / Výrobca

**EXBIO Praha, a.s.**  
Nad Safinou II 341  
252 50 Vestec, Czech Republic  
Tel: +420 261 090 666  
Fax: +420 261 090 660  
E-mail: [orders@exbio.cz](mailto:orders@exbio.cz)  
<http://www.exbio.cz>

Revision / Revize / Revízia: 05.04.2018