

# exbio

## FagoFlowEx Kit

100 essais | N° de réf. ED7042



### Mode d'emploi (FR)

Version : ED7042\_IFU\_v10\_FR

Date de publication : 06-03-2026

#### Symboles figurant sur l'étiquetage du produit

	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Limite de température
	Marquage CE de conformité		Tenir à l'écart de la lumière du soleil
	Fabricant		Garder au sec
	Identifiant unique du dispositif		Contenu
	Consulter le mode d'emploi		Marque UKCA
	Contient suffisamment d'unités pour <n> tests		Indique le mandataire en Suisse
	Référence catalogue		
	Code du lot		
	Date de péremption		

## 1. Usage prévu

Le kit FagoFlowEx est destiné à l'examen de l'activité phagocytaire des granulocytes neutrophiles en mesurant l'éclatement respiratoire (oxydatif) dans le sang total par cytométrie en flux.

### Éléments détectés et/ou mesurés

L'appareil détecte et mesure deux paramètres à l'aide du substrat fluorogène Dihydrorhodamine 123 :

- le pourcentage de granulocytes neutrophiles qui produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en réponse à l'ingestion de bactéries *E. coli* ;
- l'activité intracellulaire des enzymes productrices de ROS.

### Fonction du dispositif

Le dispositif est destiné au dépistage/aide au diagnostic de l'immunodéficience congénitale ou acquise.

### Contexte d'un état physiologique ou pathologique

L'incapacité des granulocytes neutrophiles à catalyser la production d'espèces réactives de l'oxygène provoque la maladie granulomateuse chronique (CGD), ensemble de troubles héréditaires présentant un phénotype commun d'infections bactériennes et fongiques sévères récurrentes et de formation de granulomes tissulaires<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>. Les résultats cohérents avec la CGD peuvent également provenir d'un déficit en MPO, qui est le défaut phagocytaire le plus courant se présentant généralement comme un phénotype normal sans incidence accrue d'infections<sup>(5)</sup>.

Une diminution de l'activité phagocytaire sans le défaut des enzymes productrices de ROS se produit dans le cadre de diverses autres affections cliniques associées à la suppression immunitaire, soit des déficits immunitaires variables primaires et des déficits en opsonine plasmatique, soit des déficits immunitaires secondaires<sup>(6, 7)</sup>.

### Type de dosage

Non automatisé

Quantitatif

### Type d'échantillon requis

Échantillon de sang total périphérique humain anticoagulé

### Population testée

Patient présumé présenter un défaut de la fonction des granulocytes

## 2. Utilisateur prévu

Le dispositif est destiné à un usage professionnel en laboratoire uniquement. Ne convient pas aux tests au chevet du patient ni aux auto-tests.

## Conditions de qualification

Les utilisateurs prévus doivent avoir des compétences de pointe dans l'analyse de cytométrie en flux de cellules humaines, les techniques de laboratoire standard, notamment le pipetage, ainsi que la manipulation sûre et appropriée d'échantillons dérivés du corps humain.

L'utilisateur prévu doit respecter la norme EN ISO 15189 ou d'autres normes nationales, le cas échéant.

## 3. Principe du test

Le test est basé sur la mesure de la production de ROS dans les granulocytes neutrophiles à l'aide d'un substrat fluorogène Dihydrorhodamine 123 (DHR123). Pendant le test, un échantillon de sang humain est incubé avec des bactéries *E. coli* inactivées par la chaleur et avec le DHR123. Le mélange réactionnel est porté à 37 °C pour favoriser la phagocytose des bactéries *E. coli* par les granulocytes neutrophiles. Pendant l'incubation, les bactéries sont activement englouties par les cellules tandis que le DHR123 non fluorescent pénètre passivement dans l'environnement intracellulaire selon son gradient de concentration. Les bactéries sont piégées à l'intérieur des phagosomes cellulaires et déclenchent des réactions enzymatiques qui entraînent la production de ROS. Les ions des ROS oxydent le DHR123 en rhodamine fluorescente 123 (R123), qui est excitée par le faisceau laser d'un cytomètre en flux lors de l'acquisition d'un échantillon de sang. L'émission ultérieure de lumière par la R123 correspondant à l'activité intracellulaire des enzymes produisant des ROS est collectée et analysée par cytométrie en flux.

Deux autres réactions sont effectuées en parallèle à la stimulation par *E. coli* : la réaction de contrôle négatif, qui est la réaction sans *E. coli* et la réaction de contrôle positif, qui est une réaction utilisant l'acétate de Phorbol 12-myristate 13 qui active les enzymes productrices de ROS enzymes sans phagocytose.

Les cellules sont considérées comme activement phagocytaires si leur fluorescence dépasse celle des cellules de la réaction de contrôle négatif. Le résultat est rapporté en pourcentage de cellules phagocytaires. L'intensité de fluorescence des cellules phagocytaires est directement proportionnelle à l'activité intracellulaire des enzymes productrices de ROS.

## 4. Réactif(s) fourni(s)

### Contenu

Le dispositif FagoFlowEx Kit permet de réaliser 100 tests et est fourni avec le réactif suivant :

**E. coli** (5 flacons) contenant des bactéries *E. coli* lyophilisées, 1 flacon suffit pour la stimulation de 20 échantillons sanguins (ED7042-1).

**DHR123** (5 flacons) contenant de la Dihydrorhodamine 123 lyophilisée, 1 flacon suffit pour la coloration de 60 échantillons sanguins (ED7042-2).

**Stimulation Control** (5 flacons) contenant du PMA lyophilisé (Phorbol 12-myristate 13-acétate), 1 flacon est destiné à 20 tests de contrôle positif (ED7042-3).

**Lysing Solution** (1 flacon) contenant 15 ml de solution prête à l'emploi (ED7042-4).

## 5. Matériel requis mais non fourni

Tubes à essai à fond rond de 12x75 mm

Eau déionisée (qualité réactive)

## 6. Équipement requis

Pipette automatique avec embouts jetables (10 – 1000 µl) pour le pipetage des échantillons et des réactifs

Mélangeur vortex

Thermostat (incubateur à air) ou bain-marie capable d'incuber des éprouvettes à 37 °C

Cytomètre en flux avec source d'excitation laser (488 nm), détecteurs de lumière diffuse, filtres optiques et détecteurs d'émission appropriés pour recueillir les signaux émis par les fluorochromes indiqués dans le Tableau 1.

**Tableau 1** Caractéristiques spectrales des fluorochromes utilisés dans le dispositif

Fluorochrome	Excitation [nm]	Émission [nm]
Rhodamine 123	488	525

**REMARQUE :** Le dispositif a été testé sur les cytomètres en flux BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLyric™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) et Sysmex XF-1600™ (Sysmex Corporation).

## 7. Conservation et manipulation

Conserver à une température de 2-8 °C.

Éviter l'exposition prolongée à la lumière.



Ne pas congeler.

Voir la section 10, Procédure (Préparation des réactifs) pour plus d'informations sur la stabilité en cours d'utilisation et la durée de conservation après la première ouverture, ainsi que sur les conditions de conservation et la stabilité des solutions de travail (le cas échéant).

## 8. Avertissements, précautions et limitations d'utilisation

### Classification des dangers SGH

**AVERTISSEMENT** : Lysing Solution (ED7042-4) contient du formaldéhyde (CAS n° 50-00-0) et du méthanol (CAS n° 67-56-1) à des concentrations classées comme dangereuses.

Éléments d'étiquetage	Mention d'avertissement
	<b>Danger</b>
	
<b>Mentions de danger</b>	H315: Provoque une irritation cutanée. H317: Peut provoquer une allergie cutanée. H319: Provoque une sévère irritation des yeux. H331: Toxique par inhalation. H335: Peut irriter les voies respiratoires. H341: Susceptible d'induire des anomalies génétiques. H350: Peut provoquer le cancer. EUH071: Corrosif pour les voies respiratoires.
<b>Mentions de précaution</b>	P201: Se procurer les instructions avant utilisation. P260: Ne pas respirer les vapeurs. P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux. P308+P313: EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. P403+P233: Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

Consulter la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur la page du produit à l'adresse [www.exbio.cz](http://www.exbio.cz) pour obtenir des informations complètes sur les risques qu'impliquent les substances chimiques et les mélanges contenus dans le produit, ainsi que sur la manière dont ils doivent être manipulés et éliminés.

### Danger biologique

Les échantillons biologiques et les échantillons de sang humain ainsi que toute substance entrant en contact avec ces derniers sont toujours considérés comme du matériel infectieux.

Utiliser des équipements de sécurité et de protection individuelle pour éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses.

Respecter toutes les lois, réglementations et procédures en vigueur relatives à la manipulation et l'élimination du matériel infectieux.

### **Signes de détérioration**

Les réactifs lyophilisés fournis se présentent normalement sous forme de poudre blanche (*E. coli* et Contrôle de stimulation) ou de pain solide lyophilisé (DHR123). Ne pas utiliser le réactif si un changement d'aspect est observé, par exemple un changement de couleur ou une liquéfaction.

La solution de lyse se présente normalement sous forme de liquide transparent. Ne pas utiliser le réactif si un changement d'aspect est observé, par exemple turbidité ou signes de précipitation.

### **Limitation d'utilisation**

Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur les étiquettes des produits.

## **9. Échantillon**

Utiliser du sang périphérique veineux prélevé dans un récipient pour échantillon classé comme dispositif médical, avec la présence d'anticoagulant héparine.

**MISE EN GARDE :** Les anticoagulants EDTA et citrate affectent négativement les résultats de l'analyse.

L'échantillon de sang dans le tube de prélèvement doit être conservé à température ambiante. Ne pas réfrigérer.

Traiter les échantillons de sang au plus tard 24 heures après leur prélèvement.

## **10. Procédure**

### **Préparation du ou des réactifs fournis**

#### ***E. coli***

Reconstituer le contenu du flacon d'*E. coli* dans 250 µl d'eau déionisée (concentration de travail  $3,3 \times 10^9$  bactéries par ml). Préparer un flacon chaque jour de mesure, le conserver à 2-8 °C et l'utiliser dans les 8 heures qui suivent. Ou bien le réactif peut être congelé à une température comprise entre -20 °C et -80 °C et utilisé dans les 7 jours qui suivent.

**MISE EN GARDE :** Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation.

## **DHR123**

Reconstituer le contenu du flacon de DHR123 dans 650 µl d'eau déionisée (concentration de travail : 45 µmol/l). Préparer un flacon chaque jour de mesure, le conserver à 2-8 °C et l'utiliser dans les 8 heures qui suivent. Ou bien le réactif peut être congelé à une température comprise entre -20 °C et -80 °C et utilisé dans les 7 jours qui suivent.

**REMARQUE** : La solution aliquote supportera jusqu'à 5 cycles de congélation/décongélation.

## **Stimulation Control**

Reconstituer le contenu du Contrôle de stimulation dans 250 µl d'eau déionisée (concentration de travail : 50 µmol/l). Préparer un flacon chaque jour de mesure, le conserver à 2-8 °C et l'utiliser dans les 8 heures qui suivent. Ou bien le réactif peut être congelé à une température comprise entre -20 °C et -80 °C et utilisé dans les 7 jours qui suivent.

**REMARQUE** : La solution aliquote supportera jusqu'à 5 cycles de congélation/décongélation.

## **Lysing Solution**

Le réactif est prêt à l'emploi.

**REMARQUE** : Amener le réactif à température ambiante avant utilisation.

## **Marquage d'échantillons**

1. Pour l'examen d'un patient, apposer l'étiquette d'identification appropriée des échantillons sur trois tubes à essai à fond rond de 12 x 75 mm et indiquer la mention

**Réaction stimulée par *E. coli*,**

**réaction de contrôle positif (stimulation PMA)**

**et réaction de contrôle négatif.**

Pipeter au fond des tubes à essai

- 10 µl d'*E. coli* dans le tube portant la mention Réaction stimulée par *E. coli*.
  - 10 µl de contrôle de stimulation dans le tube portant la mention Réaction de contrôle positif.
  - Ne rien pipeter dans le tube portant la mention Réaction de contrôle négatif.
2. Pipeter 50 µl d'échantillon de sang bien mélangé au fond de chaque tube à essai et mélanger délicatement au vortex.

**MISE EN GARDE :** Éviter de pipeter le sang sur le côté du tube à essai. S'il reste une gouttelette ou un frottis de sang sur le côté du tube, il se peut que celui-ci ou celle-ci ne soit pas coloré par le réactif ou que les érythrocytes ne soient pas lysés et que le résultat du test ne soit pas valide.

3. Pipeter 10  $\mu$ l de DHR123 au fond de chaque tube à essai et mélanger délicatement au vortex.
4. Placer les tubes à essai à 37 °C pendant 20 minutes dans un bain-marie ou pendant 30 minutes dans un incubateur à air.
5. Ajouter 50  $\mu$ l de solution de lyse dans chaque tube à essai. Agiter délicatement au vortex et laisser incuber les tubes à essai pendant 5 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
6. Ajouter 1 ml d'eau déionisée dans chacun des tubes à essai, agiter délicatement au vortex et laisser incuber pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
7. Récupérer l'échantillon coloré immédiatement sur le cytomètre en flux. Si l'échantillon coloré n'est pas récupéré immédiatement, boucher le tube à essai, le conserver à 2-8 °C dans l'obscurité et l'analyser dans les 2 heures qui suivent.

**MISE EN GARDE :** La fluorescence de la Rhodamine 123, produite par oxydation du DHR123, est détectée dans le canal FITC (525 nm). Étant donné que la Rhodamine 123 est rapidement libérée des granulocytes, comme illustré dans la Figure 8, les échantillons doivent être **mesurés aussitôt que possible** (au plus tard 2 heures après la lyse), de préférence dans un **intervalle de temps étroit standardisé** (voir la page 18).

**MISE EN GARDE :** Agiter au vortex l'échantillon coloré immédiatement avant la récupération sur le cytomètre en flux pour éviter les agrégats.

## **Analyse par cytométrie en flux**

Le cytomètre en flux sélectionné pour être utilisé avec le dispositif FagoFlowEx Kit doit être calibré de façon routinière à l'aide de microbilles fluorescentes pour garantir la stabilité de la sensibilité des détecteurs conformément aux instructions du fabricant du cytomètre.

S'il n'est pas correctement entretenu, le cytomètre en flux peut produire de faux résultats.

Se reporter aux spécifications du cytomètre indiquées par le fabricant concernant les lasers et les détecteurs de fluorescence selon les caractéristiques d'excitation et d'émission des fluorochromes à la section 6 Équipement requis.

Régler les tensions sur les détecteurs de fluorescence d'intérêt avant l'analyse des échantillons colorés. La tension sur un détecteur PMT doit être suffisamment élevée pour qu'un minimum d'événements colorés négativement interfèrent avec le canal 0 sur l'axe de fluorescence. En outre, la tension du détecteur PMT ne doit pas dépasser les valeurs auxquelles les événements positifs sont poussés vers l'axe droit.

Pour l'analyse des données mesurées, il est possible d'utiliser un logiciel de cytométrie développé par le fabricant ou un logiciel dédié à l'analyse des données de cytométrie hors ligne (par exemple FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

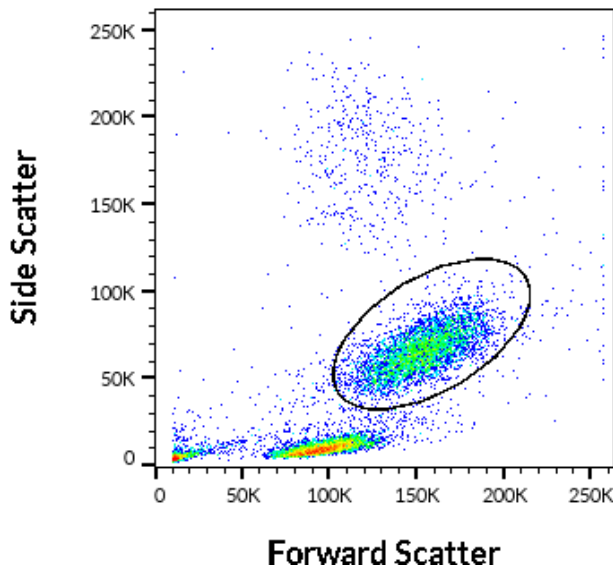
## Analyse d'un échantillon du patient

Récupérer au moins 5 000 à 10 000 événements leucocytaires. Visualiser les événements récupérés dans le graphique à points de diffusion latérale (SSC) par rapport au graphique à points de diffusion vers l'avant (FSC). Régler la trappe autour des granulocytes comme indiqué dans la Figure 1.

**MISE EN GARDE :** L'ingestion de bactéries influence la position des granulocytes dans les graphiques à points SSC-FSC. Pour cette raison, ajuster la trappe individuellement pour chaque réaction.

**REMARQUER:** Le contrôle par stimulation (PMA) induit une lyse cellulaire dans une proportion substantielle de granulocytes. La diminution graduelle du nombre de neutrophiles pourrait avoir pour conséquence de prolonger les temps d'acquisition.

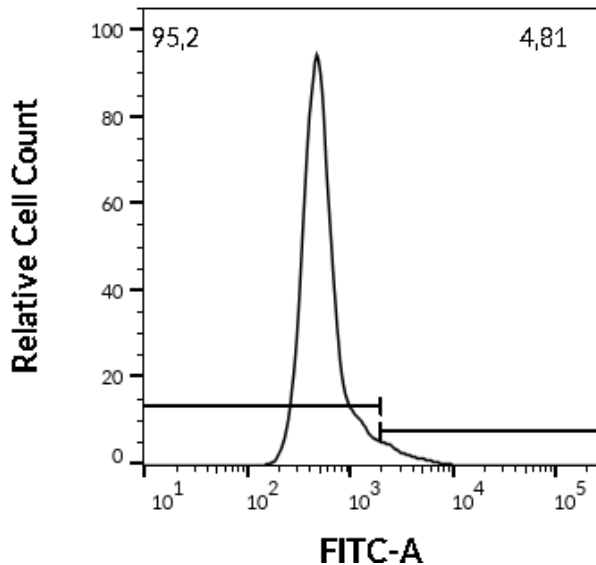
**Figure 1** Délimitation de la population de granulocytes



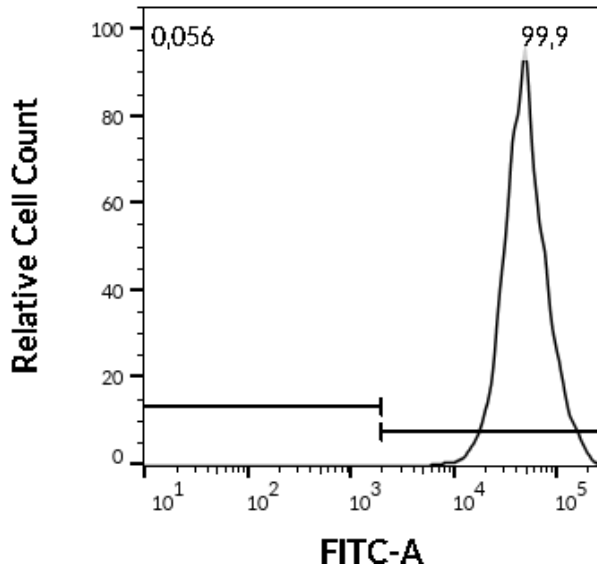
Visualiser les granulocytes délimités sous forme d'histogrammes où l'axe X représente l'intensité de la fluorescence dans le canal FITC. Utiliser la réaction de contrôle négatif pour définir une trappe appropriée afin de discriminer les granulocytes positifs (cellules productrices de ROS activement phagocytaires) et négatifs (cellules non productrices de ROS non phagocytaires). Copier la trappe dans la réaction de stimulation *E. coli* et la réaction de contrôle positif (Figures 2a, 2b, 2c).

Les granulocytes qui subissent l'éclatement oxydatif présentent une fluorescence brillante de la rhodamine 123. Calculer l'intensité moyenne de la fluorescence des granulocytes positifs et négatifs. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à l'activité intracellulaire des enzymes productrices de ROS.

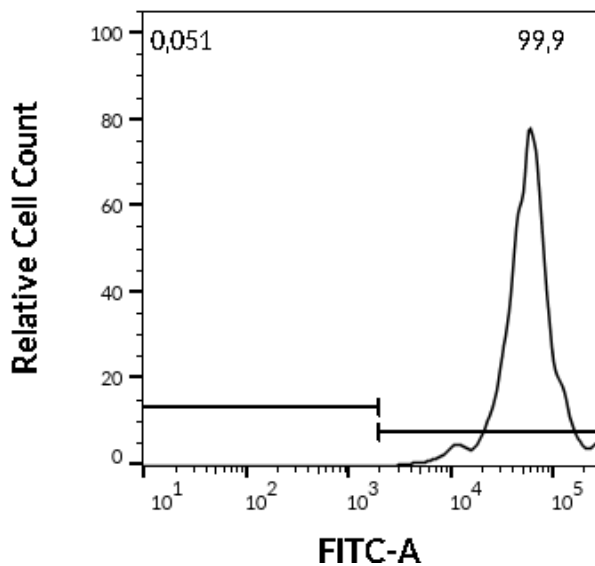
**Figure 2a** Histogramme de l'intensité de la fluorescence des granulocytes dans la réaction de contrôle négatif



**Figure 2b** Histogramme de l'intensité de la fluorescence des granulocytes dans la réaction stimulée par *E. coli*



**Figure 2c** Histogramme de l'intensité de la fluorescence des granulocytes dans la réaction de contrôle positif



## Calcul et interprétation des résultats de l'analyse

### Paramètres quantitatifs

Deux paramètres quantitatifs sont mesurés et interprétés en fonction de l'existence ou non d'une indication d'un défaut d'activité phagocytaire ou d'un défaut de production de ROS :

a) **Nombre relatif de granulocytes positifs** qui ont présenté un éclatement respiratoire après la stimulation par *E. coli*.

b) **Indice de stimulation (IS)** calculé comme le rapport moyen d'intensité de la fluorescence (IFM) des granulocytes stimulés par la réaction stimulée par *E. coli* et des granulocytes de la réaction de contrôle négatif.

### Exemple de calcul de l'indice de stimulation

Tableau 2 IFM des granulocytes

Population	FITC-A moyen
Réaction stimulée par <i>E. coli</i>	53836
Réaction de contrôle négatif	550

$$\frac{\text{MFI des granulocytes issus de la réaction stimulée par } E.coli}{\text{MFI des granulocytes issus de la réaction témoin négative}} =$$

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

**AVERTISSEMENT** : S'il existe une distribution multimodale de la fluorescence, calculez l'indice de stimulation pour chaque pic de distribution.

### Paramètres qualitatifs

L'interprétation des données qualitatives intègre des superpositions d'histogrammes pour évaluer la distribution du signal et identifier les pics individuels qui, en cas d'occurrence de plusieurs populations de granulocytes, doivent être analysés séparément.

En cas de **défauts d'éclatement respiratoire** (manque d'oxydation du DHR123), les histogrammes des granulocytes résultants montreront une distribution concordante du signal entre la réaction de stimulation par *E. coli* et la réaction de contrôle positif (Figure 4, 5, 6).

En cas de **défauts d'activité phagocytaire** (diminution de l'engloutissement des particules), les histogrammes des granulocytes résultants montreront un écart dans

la distribution du signal entre la réaction de stimulation par *E. coli* et la réaction de contrôle positif. Dans la réaction stimulée par *E. coli*, la population des granulocytes sera divisée en plusieurs pics d'intensités de la fluorescence différentes et la réaction de contrôle positif comportera un seul pic (Figure 7).

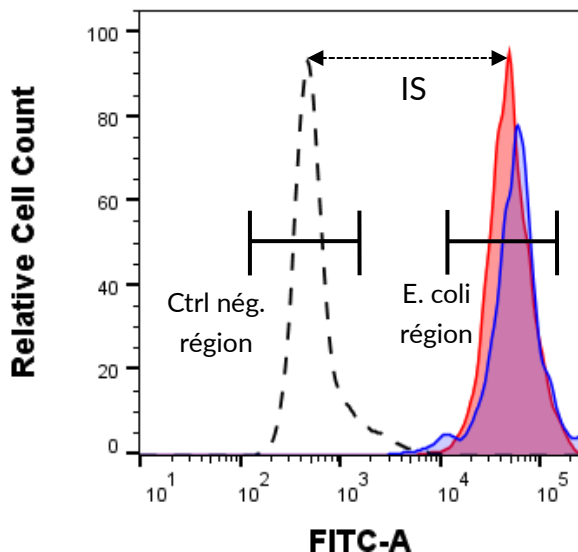
**REMARQUE :** La détection de résultats inhabituels indique uniquement la suspicion de maladie qui doit être confirmée par d'autres tests.

## Exemples

### Résultat normal d'un donneur sain

Les granulocytes présentent un éclatement respiratoire élevé après la stimulation **aussi bien** par *E. coli* que la réaction de contrôle positif (Figure 3).

**Figure 3** Superposition d'histogrammes : donneur sain sans défaut d'éclatement respiratoire (SI = 98, nombre relatif de granulocytes positifs 99,9 %). Distribution du signal des granulocytes stimulés par *E. coli* (remplis en rouge), des granulocytes de la réaction de contrôle négatif (en pointillés noirs) et des granulocytes de la réaction de contrôle positif (remplis en bleu) dans le détecteur FITC.



## Résultats indiquant un défaut d'éclatement respiratoire

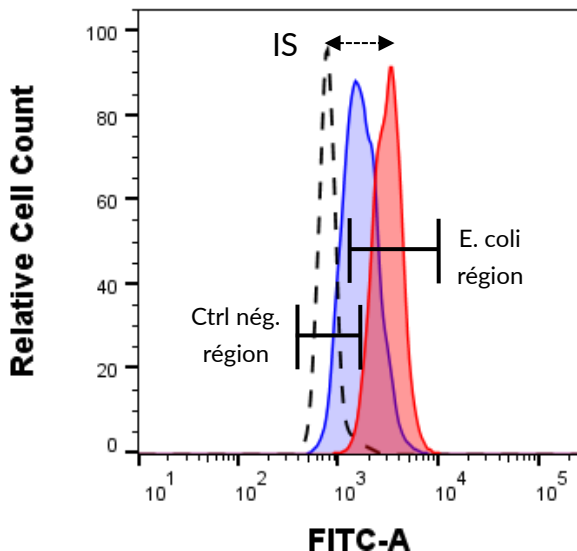
### 1) Un pic unique avec une intensité de signal faible

Si les granulocytes présentent un faible éclatement respiratoire après la stimulation aussi bien par *E. coli* que la réaction de contrôle positif, cela indique soit un **déficit en myéloperoxydase (MPO)** (Figure 4) soit une **maladie granulomateuse chronique (CGD)** moins fréquente (Figure 5). L'intensité de l'éclatement respiratoire dans la CGD dépend de la mutation du complexe enzymatique NADPH oxydase. Il existe cinq types autosomiques récessifs (1-5) et un type récessif lié à l'X de la maladie.

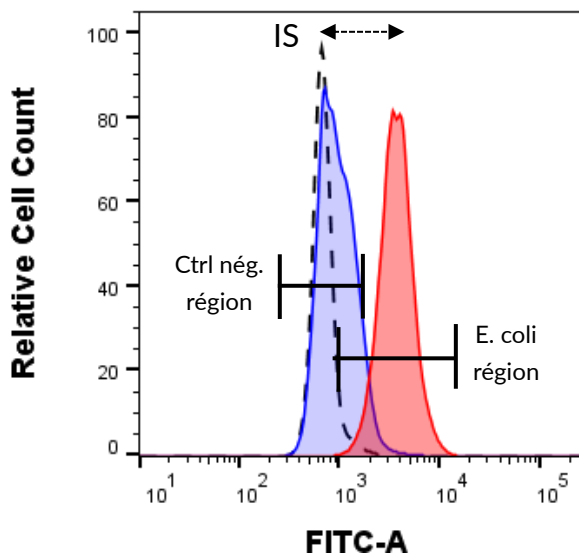
**MISE EN GARDE :** Le test ne permet pas de faire la distinction entre un déficit en CGD et un déficit en MPO.

**Figure 4** Superposition d'histogrammes : patient présentant un déficit en MPO (SI = 11, nombre relatif de granulocytes positifs 89,7 % - porte de discrimination n'est pas affichée).

Distribution du signal des granulocytes stimulés par *E. coli* (remplis en rouge), des granulocytes de la réaction de contrôle négatif (en pointillés noirs) et des granulocytes de la réaction de contrôle positif (remplis en bleu) dans le détecteur FITC.



**Figure 5** Superposition d'histogrammes : patient de sexe masculin atteint de CGD liée à l'X (SI = 16, nombre relatif de granulocytes positifs 99 % - porte de discrimination n'est pas affichée). Distribution du signal des granulocytes stimulés par E. coli (remplis en rouge), des granulocytes de la réaction de contrôle négatif (en pointillés noirs) et des granulocytes de la réaction de contrôle positif (remplis en bleu) dans le détecteur FITC.

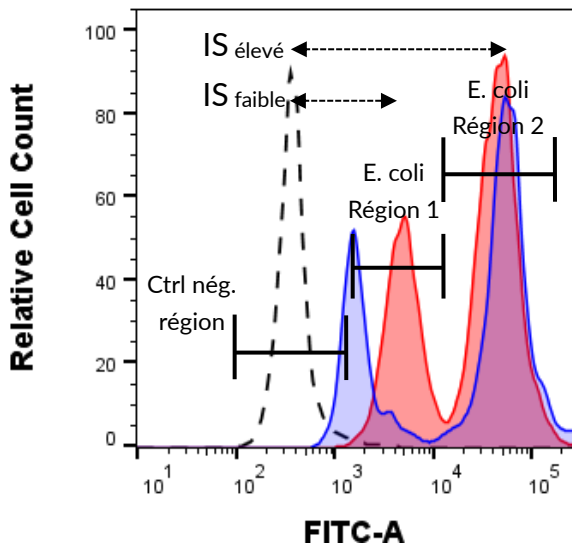


## 2) Deux pics avec différentes intensités de signal

Si les granulocytes d'une patiente **présentent deux sous-populations** différant par l'intensité de l'éclatement respiratoire après stimulation par *E. coli* et la réaction de contrôle positif (Figure 6), cela indique que la patiente est atteinte de CGD liée à l'X.-

**MISE EN GARDE :** La présence d'au moins trois pics dans l'histogramme indique une contamination de la trappe de la population des granulocytes dans les graphiques à points SSC par rapport à FSC (Figure 1) par des monocytes ou des cellules mortes non phagocytaires.

**Figure 6** Superposition d'histogrammes : patiente porteuse d'une mutation liée à l'X du gène NADPH oxydase. Deux sous-populations de granulocytes diffèrent par l'intensité de l'éclatement respiratoire (Région à faible IFM *E. coli* IS = 14, 35 % des granulocytes, région à forte MFI *E. coli* IS = 125, 65 % des granulocytes). Distribution du signal des granulocytes stimulés par *E. coli* (remplis en rouge), des granulocytes de la réaction de contrôle négatif (en pointillés noirs) et des granulocytes de la réaction de contrôle positif (remplis en bleu) dans le détecteur FITC.

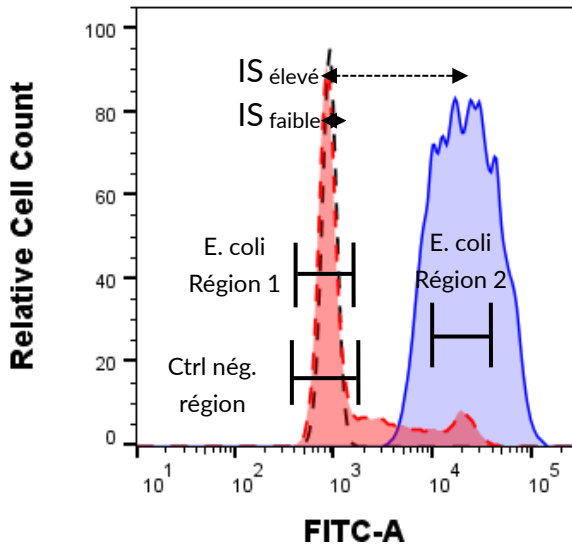


## Résultats indiquant un défaut d'activité phagocytaire

### Différent motif de pics entre la réaction de contrôle positif et la réaction stimulée par E. coli

Si les granulocytes stimulés par E. coli présentent un faible éclatement respiratoire et que les granulocytes stimulés par une réaction de contrôle positif présentent un éclatement respiratoire élevé (Figure 7), cela indique un défaut d'activité phagocytaire des granulocytes ; ou bien, l'échantillon de sang contient un anticoagulant EDTA ou citrate ou l'échantillon était ancien ou mal conservé.

**Figure 7** Superposition d'histogrammes : échantillon anticoagulé avec EDTA (Région à faible IFM E. coli IS = 1, 73 % des granulocytes, région à forte MFI E. coli IS = 25, 9 % des granulocytes). Distribution du signal des granulocytes stimulés par E. coli (remplis en rouge), des granulocytes de la réaction de contrôle négatif (en pointillés noirs) et des granulocytes de la réaction de contrôle positif (remplie en bleu) dans le détecteur FITC.



## 11. Performances analytiques

### Précision (reproductibilité et répétabilité)

La **reproductibilité** de l'essai a été déterminée à partir des données obtenues par cinq opérateurs analysant six échantillons sanguins de donneurs de sang sains le même jour et dans les mêmes conditions expérimentales.

Les paramètres suivants ont été calculés :

a) Pour la détermination du nombre relatif de granulocytes positifs

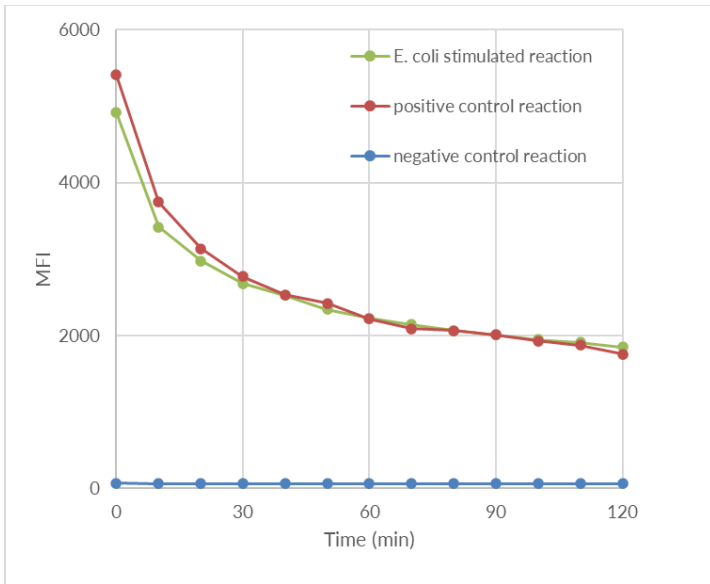
CV = 2 %

b) Pour la détermination de l'indice de stimulation

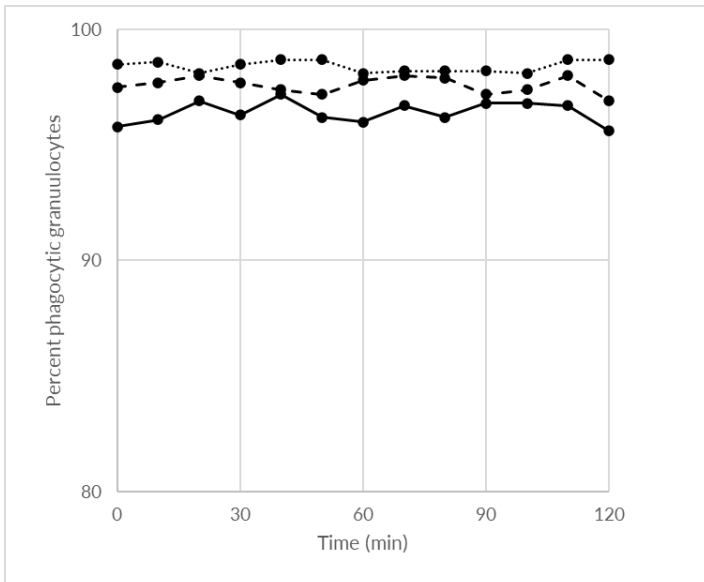
CV = 11 %

La **répétabilité** de l'essai n'a pas été déterminée. En raison de la dynamique des variations de la valeur MFI associées à la libération de R123 des cellules (Figures 8, 9, 10), les valeurs de répétabilité dépendent du temps écoulé entre la fin du traitement de l'échantillon (fixation/lyse des globules rouges) et l'analyse FACS. Il est recommandé d'effectuer l'analyse de petites séries d'échantillons et de les analyser dans l'intervalle de temps étroit standardisé. Sinon, des séries plus importantes peuvent être analysées ultérieurement, par exemple après un intervalle de temps plus important (40 minutes) pour minimiser la variabilité de la valeur MFI.

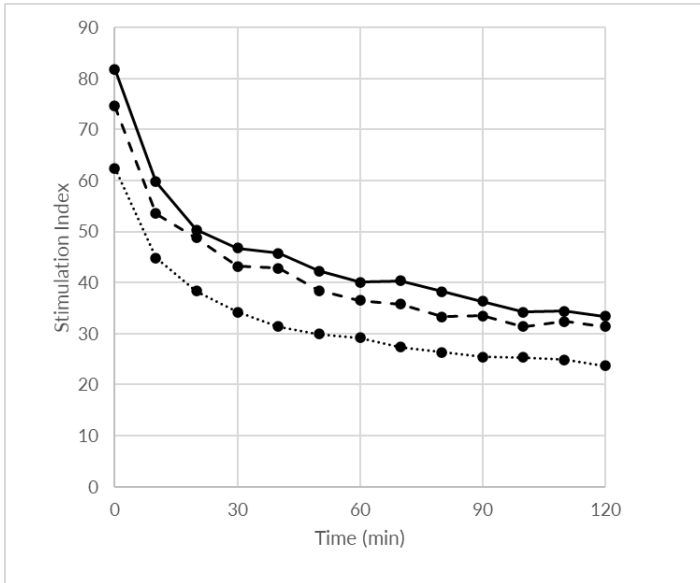
**Figure 8** Évolution de l'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) des granulocytes au fil du temps après la lyse des globules rouges, un échantillon de sang à titre d'exemple (donneur sain).



**Figure 9** Évolution de l'activité phagocytaire des granulocytes (%) au fil du temps après la lyse des globules rouges, 3 échantillons de sang différents (donneurs sains).



**Figure 10** Évolution de l'indice de stimulation au fil du temps après la lyse des globules rouges, 3 échantillons de sang différents (donneurs sains).



## 12. Performances cliniques

L'essai a été évalué par des mesures comparatives avec PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) en utilisant des échantillons prélevés sur un total de 47 patients (Tableau 3). Les deux kits ont pu détecter : a) un échec de l'ingestion de particules (faible activité phagocytaire) et b) des troubles de l'éclatement oxydatif (déficit en MPO, CGD) avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 100 %.

**Tableau 3** Caractéristiques des patients dans l'étude d'évaluation des performances

Caractéristique du patient	n
Donneur sain (trouble immunologique non apparenté)	40
CGD (2 malades et un patient atteint de CGD)	3
Déficit en MPO	2
Faible activité phagocytaire (modèle de maladie - anticoagulant EDTA)	2
Échantillons anciens (mesures répétées de donneurs sains en 48 heures)	4

### 13. Valeurs attendues

La plage normale d'éclatement respiratoire des granulocytes a été déterminée à partir de 40 échantillons de sang périphérique d'adultes en bonne santé.

- Granulocytes présentant un éclatement respiratoire  
90-100 %
- Indice de stimulation des granulocytes > 30  
3<sup>e</sup> percentile = 31  
Médian = 56  
97<sup>e</sup> percentile = 97

Étant donné que l'indice de stimulation peut varier selon les laboratoires et les instruments, chaque laboratoire DOIT IMPÉRATIVEMENT définir la plage normale en utilisant ses propres conditions de test sur des échantillons prélevés auprès de la population locale de donneurs normaux.

### 14. Substances interférentes et limitations

Les anticoagulants EDTA et citrate affectent négativement les résultats de l'analyse.

### 15. Références

- 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: Klempler, M.S., Styr, 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](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1279-3_6)

## 16. Marques commerciales

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™, BD Multitest™ et FlowJo™ sont des marques déposées de Becton, Dickinson and Company, Sysmex™ est une marque déposée de Sysmex Corporation, VenturiOne® est une marque déposée d'Applied Cytometry, Infinicyt™ est une marque déposée de Cytognos S.L..

## 17. Historique des révisions

Version 10, ED7042\_IFU\_v10

Modification de la classification des dangers pour un composant ED7042-4 Lysing Solution.

## 18. Fabricant

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

### Coordonnées

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

## 19. Représentants autorisés

Suisse Personne responsable

EUMEDIQ AG  
Grafenauweg 8  
CH-6300 Zug  
Switzerland  
[www.eumediq.eu](http://www.eumediq.eu)

**REMARQUE :** Tout incident grave survenu en relation avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente locale.