

OPIS



exbio

Инструкция по применению медицинского изделия
для диагностики *in vitro*

**Набор реагентов для исследования
фагоцитарной активности гранулоцитов
«FagoFlow Ex»**

Версия 202007 от 30.10.2022

1. ОПИСАНИЕ НАЗНАЧЕНИЯ (назначение, научная обоснованность анализа и описание патологии и пр.)

а) Набор реагентов для исследования фагоцитарной активности гранулоцитов «FagoFlowEx» (далее по тексту Набор реагентов или FagoFlowEx) предназначен для исследования фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов путём измерения респираторного взрыва после их стимуляции бактериями кишечной палочки в гепаринизированной цельной крови человека с использованием проточной цитометрии.

б) Функциональное назначение. Набор реагентов используется в качестве вспомогательного теста при диагностике дисфункции фагоцитарных клеток.

в) Врожденная иммунная реакция защищает организм человека от инфекционных агентов. Одним из важнейших компонентов врожденного иммунного ответа является респираторный взрыв фагоцитов, в ходе которого генерируются активные формы кислорода (АФК), которые убивают патогенные микроорганизмы.

Количественное определение АФК, продуцируемых фагоцитами, дает информацию о способности организма устанавливать надежный врожденный иммунный ответ.

Пациенты с иммунодефицитами изначально выявляются клинически по истории рецидивирующей инфекции. Ответственный специфический инфекционный агент – это определяющий фактор, оказывающий влияние на часть иммунной системы. Врожденные дефекты иммунной системы подразумевают в основном дисфункцию комплемента и фагоцитов, которые серьезно ослабляют способность пациента бороться с инфекциями, несмотря на кажущуюся эффективную адаптивную иммунную реакцию.

Помимо разнообразных нарушений миграции клеток наиболее распространенные врожденные генетические дефекты иммунной системы, нацеленные на фагоцитарную и бактерицидную активность нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и макрофагов, вызваны дефицитом миелопероксидазы (МПО) [1], хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) [2]. Перечисленные дефекты приводят к хроническим инфекционным заболеваниям, вызванными конкретными патогенами (бактериями, дрожжами и грибами), устойчивыми к стандартному лечению.

Респираторный (окислительный) взрыв ухудшается в условиях ХГБ и дефицита МПО. В совокупности указанные генетические дефекты препятствуют накоплению продуктов окисления, и, следовательно, фагоциты не способны эффективно разрушать внутриклеточные или захваченные внеклеточные патогены.

ХГБ является клинически и генетически разнообразной группой наследственных заболеваний с дефицитом множественных ферментов НАДФН-оксидазного каскада, генерирующих реактивные кислородные радикалы, используемые для уничтожения патогенов. Пациенты с X-сцепленной формой ХГБ имеют дефекты в X-сцепленном гене CYBB, кодирующем субъединицу gp91phox флавоцитохрома b558 [3, 4]. Активная НАДФН-оксидаза здоровых индивидуумов ускоряет реакцию НАДФН (восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата) с кислородом, производя НАДФ+ и супероксидный радикал O_2^- , который подвергается дальнейшим сериям реакций для получения синглетного кислорода и перекиси водорода, позже преобразуемого миелопероксидазой. Пациенты с ХГБ страдают пневмонией, абсцессами кожи, тканей и органов, гнойным артритом, остеомиелитом, бактериемией/грибковой инфекцией и поверхностными кожными инфекциями, такими как флегмона или импетиго [5]. При этом персистирующая инфекция может привести к образованию тканевых гранул, вызванных чрезмерным синтезом CD4+ Т-клеточных цитокинов - фактора некроза опухолей (ФНО) и интерферона-гамма (ИФН-гамма).

Важным фактором является то, что пациенты с ХГБ не только страдают от рецидивирующих инфекций, но, с другой стороны, также и чрезмерными воспалительными, неинфекционными состояниями [6].

Дефицит МПО представляет собой генетическое расстройство, характеризующееся дефицитом, как по количеству, так и по функциональной активности, нижестоящего фермента

миелопероксидазы, образующего гидроксильный радикал и гипохлорит из перекиси водорода. Гипохлорит считается наиболее эффективным бактерицидным агентом, продуцируемым во время респираторного взрыва [7]. Дефицит МПО может проявляться в виде склонности к рецидивирующим грибковым инфекциям и инфекциям с поражением слизистых и внутренних органов.

Все вышеупомянутые заболевания, связанные с функцией фагоцитов, демонстрируют их критически важную роль в уничтожении возбудителей при сохранении гомеостаза в организме человека.

г) Материалом для проведения анализа служит гепаринизированная цельная кровь человека.

д) Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*, для всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОКАЗАНИЯ, ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ И ПР.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Потенциальный потребитель – средний и высший медицинский персонал, прошедший соответствующую профессиональную подготовку.

Один Набор реагентов предназначен для проведения 100 исследований фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов в гепаринизированной цельной крови человека.

Показания к применению – необходимость исследования первичных иммунодефицитов с дефектами фагоцитарных клеток: хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) - X-сцепленная форма, дефицит миелопероксидазы (МПО).

Противопоказания к применению – противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Данное исследование основано на измерении респираторного взрыва (окислительного взрыва) нейтрофильных гранулоцитов после их стимуляции бактериями *E. coli* (кишечная палочка). Во время процесса фагоцитоза бактерий фагоциты активируют НАДФН-оксидазу, производя реактивные окислительные промежуточные продукты (респираторный взрыв). Образующиеся ионы гипохлорита внутри фагоцитов активно окисляют дигидрорадамин 123 (ДГР123) до флуоресцентного родамина 123, который измеряется проточным цитометром. В случае дефицита МПО ДГР123 окисляется с меньшей интенсивностью другими окислительными продуктами, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции стимулированных гранулоцитов. Положительная контрольная проба стимулируется с помощью форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА), который активирует респираторный взрыв гранулоцитов без адгезии и фагоцитоза патогена.

4. РЕАГЕНТЫ

- ED7042-1 - *E.coli* – содержит лиофилизированные бактерии *E. coli*, 1 флакон рассчитан на стимуляцию нейтрофильных гранулоцитов в 20 пробирках с гепаринизированной цельной кровью человека.
- ED7042-2 - ДГР123 – содержит лиофилизированный дигидрорадамин 123, 1 флакон рассчитан на окрашивание 60 пробирок с гепаринизированной цельной кровью человека.
- ED7042-3 – Контроль стимуляции – содержит лиофилизированный форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА), 1 флакон рассчитан на стимуляцию 20 положительных контрольных проб.
- ED7042-4 - Лизирующий раствор – содержит метанол и формальдегид.

5. СОСТАВ И ВНЕШНИЙ ВИД

Кат. №	Количество	Наименование	Форма
ED7042-1	5	<i>E.coli</i>	Лиофилизированная
ED7042-2	5	ДГР 123	Лиофилизированная
ED7042-3	5	Контроль стимуляции	Лиофилизированная
ED7042-4	1	Лизирующий раствор	Раствор, 15 мл
-	1	Инструкция по применению	-

E.coli – лиофилизированный порошок от белого до светло-желтого цвета

ДГР 123 – лиофилизированный порошок от белого до светло-желтого цвета

Контроль стимуляции – лиофилизированный порошок от белого до светло-желтого цвета

Лизирующий раствор – раствор 15 мл, прозрачная бесцветная жидкость

6. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Пробирки с гепарином для взятия крови.
- Пробирки 12х75 мм, объемом 5 мл, для пробоподготовки.
- Дистиллированная вода для пробоподготовки.
- Автоматические пипетки объемом 10-1000 мкл для пробоподготовки.
- Наконечники для автоматических пипеток для пробоподготовки.
- Центрифуга (вортекс) лабораторная для пробоподготовки.
- Термостат или водяная баня (37°C) для пробоподготовки.
- Проточный цитофлуориметр с синим лазером (488 нм), детекторами для измерения прямого и бокового светорассеяния и как минимум одним флуоресцентным каналом с полосовым фильтром 525 нм.

7. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ¹

Чувствительность: 100%

Специфичность: > 95%

Воспроизводимость результатов анализа

КВ^{фагоцитарная активность гранулоцитов} ≤ 5%

КВ^{индекс стимуляции} ≤ 20%

Повторяемость результатов анализа

КВ^{фагоцитарная активность гранулоцитов} ≤ 3%

КВ^{индекс стимуляции} ≤ 20%

(КВ – коэффициент вариации)



- Способность метода различать интересующий аналит и другие компоненты образца, включая компоненты матрикса, не поддается количественной оценке.
- В рамках анализа на проточном цитометре не измеряют специфический аналит, для которого характерны низкие значения анализируемых данных, отличные от фонового шума. На проточном цитометре измеряют снижение сигнала от средней популяции.
- В рамках анализа измеряют флуоресценцию определенного подмножества клеток.
- Специфическое различение фона и сигнала зависит от производительности и настроек конкретного цитометра.
- Теоретическое значение относительного количества гранулоцитов, которые проявляли респираторный взрыв (фагоцитарную активность) варьирует от 0% до 100%.
- Теоретическое значение индекса стимуляции зависит от производительности и настроек цитометра, при этом минимальное значение равно 1, а максимальное

¹ Аналитические характеристики выведены производителем на проточном цитометре Beckman Coulter Cytomics FC500

значение варьирует от 100 до 1000, в зависимости от производительности и настроек цитометра.

- Метод не предполагает использование порогового значения. Различие между положительным и отрицательным результатом зависит от сравнения полученных результатов с референсным (нормальным) диапазоном.

8. РАСЧЁТЫ

Нормальный диапазон фагоцитарной активности гранулоцитов и индекса стимуляции гранулоцитов определяется каждой лабораторией самостоятельно в связи со спецификой использования различного детектирующего оборудования (цитометров). Нормальный диапазон фагоцитарной активности гранулоцитов и индекса стимуляции гранулоцитов может в значительной степени варьироваться от прибора к прибору.

Для определения нормального диапазона фагоцитарной активности гранулоцитов и индекса стимуляции рекомендуется провести исследование не менее 40 проб гепаринизированной цельной крови от пациентов, не имеющих дефектов иммунной системы, связанных с дисфункцией фагоцитарных клеток с использованием Набора реагентов.

Полученные значения фагоцитарной активности гранулоцитов проанализировать от меньшего к большему и выставить нормальный диапазон (например: 90 – 100%).

Полученные значения индекса стимуляции гранулоцитов проанализировать с точки зрения однородности результатов и установить процент выпадающих результатов (например, из 40 проб 1 находилась за пределами однородной выборки –2,5%). Далее для полученной выборки за вычетом выпадающих результатов рассчитывается значение перцентиля (например, 3% перцентиль), который и будет являться нижней границей нормального диапазона индекса стимуляции (например, >30).



- Воспроизводимость результатов анализа в значительной степени зависит от точности процедуры (времени инкубации, температуры, дозирования).
- Проточный цитометр может выдавать ложные результаты в случае нерегулярной калибровки и нарушений процедуры технического обслуживания.
- Измерение интенсивности флуоресценции выполняется при 430В, подаваемых на детектор измерения прямого и бокового светорассеяния.
- Следует обеспечить правильную регулировку проточного цитометра и стандартизацию измерения интенсивности флуоресценции.

9. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В ходе клинических испытаний медицинского изделия (МИ) – Набор реагентов для исследования фагоцитарной активности гранулоцитов «FagoFlowEx», было проанализировано 100 образцов. в том числе:

- 50 образцов от здоровых доноров,
- 25 образцов от здоровых доноров, собранные в пробирки с ЭДТА (ингибирование фагоцитоза патогенов),
- 25 образцов от здоровых доноров, собранные в пробирки с цитратом натрия (ингибирование фагоцитоза патогенов),
- 2 образца от пациентов с дефицитом миелопероксидазы (МПО),
- 8 образцов пациента с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ), X-сцепленная форма,
- 1 образец пациента женского пола - носителя хронической гранулематозной болезни (ХГБ), сцепленной с X-хромосомой.

Диагностическая чувствительность Набора реагентов при исследовании цельной крови человека составила 100% (доверительная вероятность 95%, ДИ: 76,2% - 100%) при 11 положительных образцах.

Диагностическая специфичность Набора реагентов при исследовании цельной крови человека составила 100% (доверительная вероятность 95%, ДИ: 97,0% - 100%) при 100 отрицательных образцах.

10. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Потенциальный риск применения Набора реагентов – класс 2б.
- Набор реагентов предназначен только для *in vitro* диагностики. Этот комплект CE-IVD соответствует европейской Директиве 98/79/ЕС по медицинским изделиям для диагностики *in vitro*.
- Перед работой с медицинским изделием необходимо ознакомиться с инструкцией по применению.
- Не использовать Набор реагентов после истечения срока годности.
- Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагентов не соответствует описанию.
- Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Любое несоблюдение процедуры исследования может привести к ложным результатам.
- Избегать длительного воздействия света на ДГР123 (ED7042-2).
- Избегать загрязнения компонентов Набора.
- Следует соблюдать особую осторожность при обращении с компонентами набора, чтобы не загрязнять их образцами крови или другими реагентами, используя одноразовые наконечники для пипеток и используя необходимые лабораторные средства индивидуальной защиты, такие как перчатки и средства защиты глаз.
- При профессиональном применении в клинических лабораториях все исследуемые образцы считаются потенциально опасными, и обращаться с ними следует так же, как и с возбудителями инфекции. Оператор, работающий с Набором реагентов, должен использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует обрабатывать и утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 (Класс Б).
- Набор реагентов не содержит: лекарственные средства для медицинского применения, материалы человеческого и животного происхождения, материалы, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.
- Воздействие на функционирование внешних факторов в диапазоне их возможного изменения при применении Набора в медицинских учреждениях - не существенно, включая электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температуру воздуха.
- Применение Набора реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады.
- Применение Набора реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав материала не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.
- Противопоказаний в рамках установленного производителем назначения не имеет.
- Паспорт безопасности предоставляется при профессиональном применении по запросу.

11. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для проведения анализа служит гепаринизированная цельная кровь человека.

- Необходимо следовать инструкции производителя пробирки для обеспечения достижения правильного объема заполнения
- Пробу крови необходимо отбирать в пробирку, содержащую гепарин. Антикоагулянты ЭДТА (двукальевая, трикальевая и двунатриевая соли) и цитрат натрия оказывают негативное влияние на результаты анализа.

• Пробы крови необходимо обрабатывать в течение 24 часов после сбора и хранить при комнатной температуре (от 18 до 25°C).

12. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа использовать гепаринизированную цельную кровь (не позднее, чем через 24 часа после отбора). Подготовить реагенты в соответствии со следующими инструкциями.

Подготовка реагентов перед анализом:

1. Восстановить лиофилизированные бактерии *E.coli*, используя 250 мкл деминерализованной воды. Неиспользованный объем суспензии хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов. В качестве альтернативного варианта суспензию можно разделить на аликвоты, заморозить один раз и хранить при температуре ниже минус 20°C для следующего использования. Использовать замороженный раствор *E. coli* в течение 7 дней после восстановления. Избегать повторных циклов замораживания/размораживания.
2. Восстановить лиофилизированный ДГР123, используя 650 мкл деминерализованной воды, и аккуратно перемешать переворачиванием, не взбалтывать. Неиспользованный объем реагента хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 8 часов. В качестве альтернативного варианта реагент можно разделить на аликвоты, заморозить один раз и хранить при температуре ниже минус 20°C для следующего использования. Использовать замороженный раствор ДГР123 в течение 7 дней после восстановления. Выдерживает 5 циклов замораживания/размораживания. Хранение замороженного реагента может привести к снижению индекса стимуляции до 20%.
3. Восстановить лиофилизированный Контроль стимуляции, используя 250 мкл деминерализованной воды. Неиспользованный объем реагента хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов. В качестве альтернативного варианта реагент можно разделить на аликвоты, заморозить один раз и хранить при температуре ниже минус 20°C для следующего использования. Использовать замороженный раствор Контроля стимуляции в течение 7 дней после восстановления. Выдерживает 5 циклов замораживания/размораживания.
4. Лизирующий раствор готов к использованию.

Процедура анализа:

Для исследования одного образца крови подготавливают пробирки для отрицательной контрольной пробы, положительной контрольной пробы и пробы для стимуляции с помощью бактерий *E. coli*.

1. В пробирки, предназначенные для:
 - стимулированной пробы: добавить 10 мкл суспензии *E.coli*,
 - отрицательной контрольной пробы: ничего не добавлять,
 - положительной контрольной пробы: добавить 10 мкл Контроля стимуляции.
2. Добавить 50 мкл гепаринизированной цельной крови во все пробирки и осторожно перемешать смесь на вортексе.
3. Добавить 10 мкл ДГР123 во все пробирки и осторожно перемешать смесь на вортексе.
4. Инкубировать пробирки при 37°C в течение 20 минут на водяной бане или 30 минут в воздушном инкубаторе.
5. Добавить 50 мкл лизирующего раствора во все пробирки, аккуратно встряхнуть и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.
6. Добавить 1 мл деминерализованной воды во все пробирки, осторожно перемешать смесь на вортексе и инкубировать в течение 5-10 минут при комнатной температуре (от 18 до 25°C) до тех пор, пока эритроциты не лизируются.



Флуоресценция родамина 123, полученного окислением ДГР123, измеряется в канале ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат) (525 нм). Поскольку родамин 123 быстро высвобождается из гранулоцитов, пробы необходимо измерять как можно быстрее (не позднее, чем через 2 часа после лизиса), предпочтительно в

стандартном сжатом временном интервале (Рис.1).

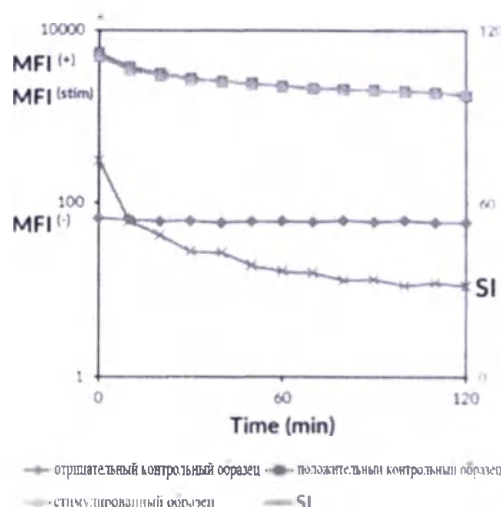


Рис.1 График развития средней интенсивности флуоресценции гранулоцитов (MFI - СИФ) и индекса стимуляции (SI - ИС) во времени после лизиса эритроцитов

Анализ на проточном цитометре:

1. Проанализировать окрашенные пробы с помощью проточного цитометра.
2. Получить по меньшей мере 5000-10000 лейкоцитов на пробу.
3. Вывести на экран данные, измеренные для стимулированной пробы, положительной и отрицательной контрольной пробы в виде точечной диаграммы бокового светорассеяния (SSC) и прямого светорассеяния (FSC).
4. Установить «гейт» (логическое ограничение, используемое для селекции событий при анализе по нескольким скоррелированным параметрам) вокруг гранулоцитов, как показано на Рис. 1 (см.п.15). Фагоцитоз бактерий влияет на положение гранулоцитов на диаграмме SSC-FSC. В связи с этим рекомендуется устанавливать «гейт» отдельно для каждого образца крови.
5. Затем перенести отмеченные «гейтом» гранулоциты на гистограммы, как показано на Рисунках 2а, 2б, 2с (см.п.15), где ось X содержит значения интенсивности флуоресценции в канале ФИТЦ (FL1).
6. Установить соответствующие «гейты» для расчёта процента положительных и отрицательных гранулоцитов и их средней интенсивности флуоресценции (далее - СИФ или MFI). Стимулированные гранулоциты, которые подвергаются окислительному взрыву, проявляют яркую флуоресценцию родамина 123.



Проточный цитометр необходимо регулярно калибровать с помощью флуоресцентных микрогранул для обеспечения стабильной чувствительности детекторов.

13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате исследования, которое может указывать на дефекты респираторного взрыва, получают два параметра:

1. **Относительное число положительных гранулоцитов**, которые демонстрировали респираторный взрыв после стимуляции бактериями *E.coli*.
2. **Индекс стимуляции**, который представляет собой отношение СИФ положительных гранулоцитов пробы, стимулированной бактериями *E.coli* и отрицательных гранулоцитов отрицательной контрольной пробы (см.п.15). Индекс стимуляции используется для ориентировочного сравнения интенсивности респираторного взрыва в образцах крови. Поскольку индекс стимуляции может варьироваться в условиях разных лабораторий на разных приборах,

каждая лаборатория должна установить свой диапазон нормальных значений, используя собственные условия проведения испытаний.

14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальный диапазон активности респираторного взрыва гранулоцитов был определён «Иммуниа с.р.о.» (Кршишикова 77, Прага 8, Чехия) в ходе исследования образцов цельной периферической крови, антикоагулированных гепарином от 40 здоровых взрослых индивидуумов (исследовали в течение 24 часов после забора крови).

Фагоцитарная активность гранулоцитов (относительное количество положительных гранулоцитов, стимулированных бактериями *E.coli*) - 90-100%.

Индекс стимуляции гранулоцитов > 30.

Таким образом, соответствие полученных результатов для исследуемого образца нормальным диапазонам свидетельствует об отсутствии дисфункции фагоцитарных клеток у пациента.

Аномальные результаты (потенциальные дефекты респираторного взрыва):

1. Низкий индекс стимуляции

а) Если гранулоциты проявляют низкий респираторный взрыв после их стимуляции как бактериями *E.coli*, так и стимуляционной контрольной пробой (ФМА), это может указывать на наиболее частый дефект - **дефицит миелопероксидазы (МПО)**. Индекс стимуляции снижается примерно до 1/10 от нормального значения (Рис.4, см.п.16).

б) Реже, если гранулоциты не демонстрируют респираторный взрыв или проявляют слабый респираторный взрыв после их стимуляции как бактериями *E.coli*, так и стимуляционной контрольной пробой (ФМА), это может указывать на **Хроническую гранулематозную болезнь (ХГБ)**. Интенсивность респираторного взрыва (индекс стимуляции) зависит от мутации нескольких ферментов НАДФН-оксидазного каскада. Если стимулированные гранулоциты пациента женского пола демонстрируют две субпопуляции, различающиеся по интенсивности респираторного взрыва, это может указывать на дефект в X-сцепленном гене. В этом случае часть гранулоцитов демонстрирует стандартную интенсивность респираторного взрыва, а другая часть – пониженную (Рис.5, см.п.16).

2. Если положительная контрольная проба (стимулированная Контролем стимуляции) показала положительный результат, а испытуемая проба (стимулированная бактериями *E. coli*) – отрицательный, образец крови, вероятно, содержит антикоагулирующую ЭДТА (двукалиевая, трикалиевая и дунатриевая соли) или цитрат натрия.

№	Стимуляция бактериями <i>E.coli</i>		Стимуляция контрольной пробой (ФМА)		Интерпретация
	ФА	ИС	ФА	ИС	
1	90 – 100%	> 30	90 – 100%	> 30	Отсутствие дисфункции фагоцитарных клеток у пациента
2	90 – 100%	< 30	90 – 100%	< 30	Подозрение на дефицит МПО или ХГБ
3	нестандартное распределение популяции гранулоцитов (бимодальное распределение)*	нестандартное распределение популяции гранулоцитов (бимодальное распределение)*	нестандартное распределение популяции гранулоцитов (бимодальное распределение)*	нестандартное распределение популяции гранулоцитов (бимодальное распределение)*	Для пациента женского пола подозрение на дефект в X-сцепленном гене
4	< 90%	< 30	90 – 100%	> 30	Образец крови, вероятно, содержит антикоагулирующую ЭДТА или цитрат натрия

* при нестандартном распределении популяции гранулоцитов наблюдаются отличающиеся значения интенсивности флуоресценции респираторного взрыва: ИС популяции 1 < 30, ИС популяции 2 > 30, значение ФА не нормировано, может быть как >90%, так и <90%



Получение аномальных результатов, описанных выше, указывает только на подозрение на заболевание, которое необходимо подтвердить другими испытаниями. Дефицит МПО может быть подтверждён внутриклеточным окрашиванием гранулоцитов с использованием моноклональных антител к МПО (например, клон CLB-MPO-1/1, № 1F-635-T100). Дефекты НАДФН-оксидазы (ХГБ) должны подтверждаться генетическим анализом.

15. ПРИМЕР АНАЛИЗА ДАННЫХ

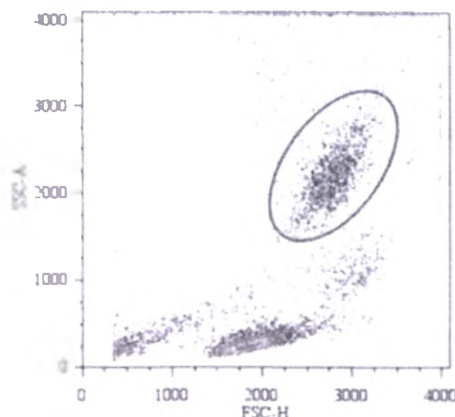


Рис. 1 Разграничение популяции гранулоцитов

Нестимулированные гранулоциты
(отрицательная контрольная проба)

Популяция	Количество (%)	Среднее FL1
Отрицательная	98,2	33,3
Положительная	1,77	751

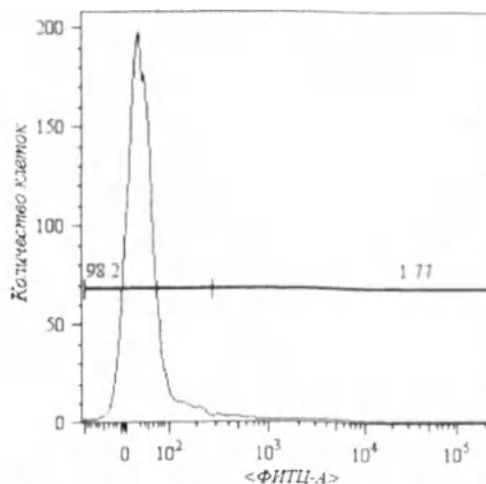
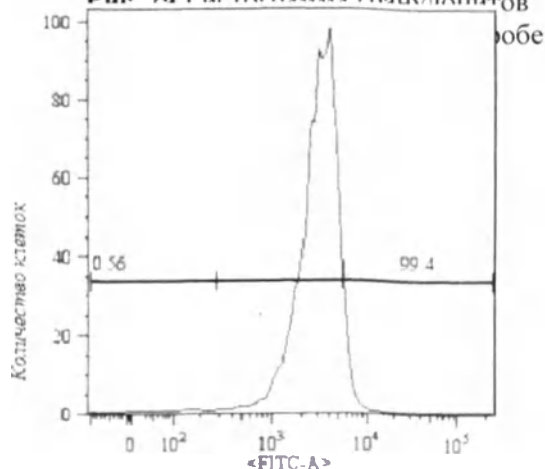


Рис. 2а Гистограмма гранулоцитов

Стимулированные гранулоциты

Популяция	Количество (%)	Среднее FL1
Отрицательная	0,56	130
Положительная	99,4	3391



Расчет:

Индекс стимуляции = $3391/33,3 = 102$

Рис. 2b Гистограмма стимулированных гранулоцитов

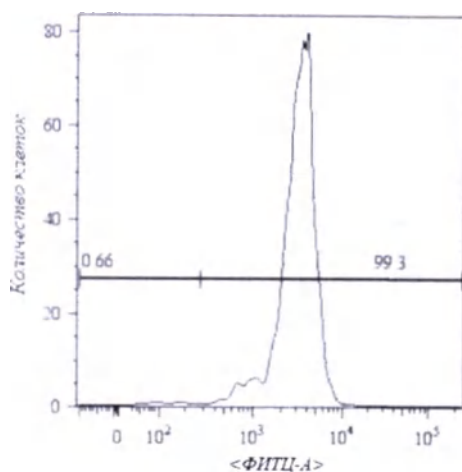


Рис. 2с Гистограмма гранулоцитов в положительной контрольной пробе

16. ПРИМЕР ДЕФЕКТА РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА

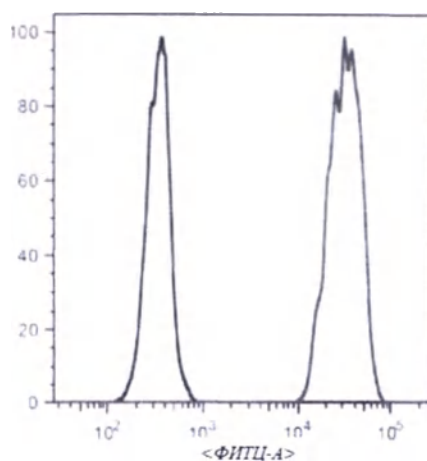


Рис. 3 Донор без дефекта респираторного взрыва (ИС = 98)

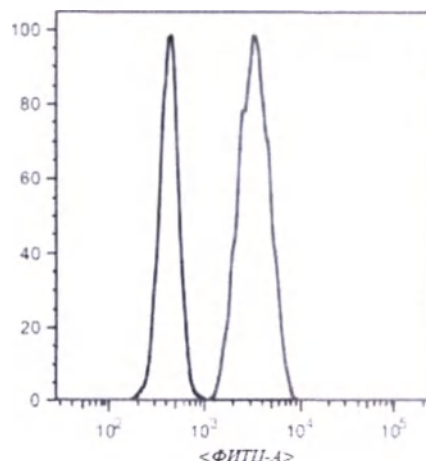


Рис. 4 Пациент с дефицитом миелопероксидазы (ИС = 8,2)

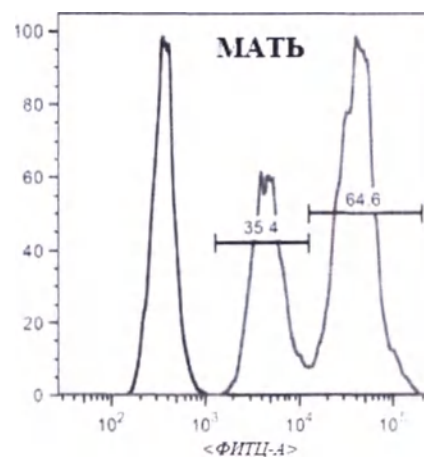
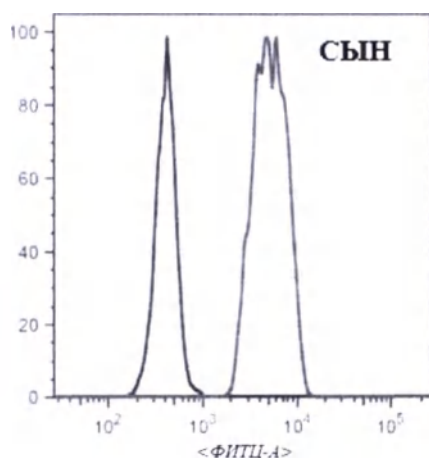


Рис. 5 Пациент мужского пола (левый рисунок) с хронической гранулематозной болезнью и его мать (правый рисунок), носитель X-сцепленной мутации НАДФН-оксидазы.

ИС пациента = 13,6.

У матери наблюдалось две субпопуляции гранулоцитов, отличающихся интенсивностью респираторного взрыва:

ИС_{низкий} = 13,9; ИС_{высокий} = 125.

ИС – Индекс стимуляции

Синяя линия – Гранулоциты в отрицательной контрольной пробе

Красная линия – Гранулоциты, стимулированные бактериями E. Coli.

16. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества Набора реагентов при изготовлении методами функционального и визуального контроля осуществляет ОКК предприятия изготовителя согласно комплекту технических документов. Новая партия сравнивается во время КК с двумя последними соответствующими партиями. Различия, обнаруженные между партиями, оцениваются специалистом по контролю качества, который принимает решение о том, является ли новая партия соответствующей или не соответствующей требованиям.

17. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Хранение Набора реагентов в закрытой упаковке производителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8°C.

Набор реагентов стабилен на протяжении всего срока годности, указанного на упаковке.

Восстановленные компоненты Набора реагентов такие как, E. coli и Контроль стимуляции, стабильны в течение 24 часов при температуре от 2 до 8°C.

Восстановленный компонент ДГР123 может храниться при температуре от 2 до 8°C не более 8 часов, хранение в течение ≥ 8 часов может привести к получению ложноположительных результатов.

Восстановленные компоненты Набора реагентов такие как, E. coli и Контроль стимуляции, стабильны в течение 7 дней при температуре ниже минус 20°C.

Восстановленный компонент ДГР123 стабилен в течение 14 дней при температуре ниже минус 20°C.

Восстановленные замороженные компоненты ДГР123 и Контроль стимуляции выдерживают 5 циклов замораживания/размораживания.

Проведение исследования с использованием Набора реагентов должно осуществляться при комнатной температуре (от 18 до 25°C).

Набор реагентов не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

Набор реагентов не имеет принадлежностей, медицинских изделий или изделий, не являющихся медицинскими, но предусмотренных для использования в комбинации с Набором реагентов.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

18. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Упакованные Наборы реагентов транспортируют всеми видами крытых транспортных средств, в соответствии с правилами перевозок грузов, действующими на данном виде транспорта.

Наборы реагентов в транспортной упаковке устойчивы к воздействию механических факторов, возникающих при транспортировании.

Условия транспортирования – при температуре от 2 до 8°C, относительная влажность воздуха не более 80%.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

19. УТИЛИЗАЦИЯ

2.1. Использованные компоненты Набора, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, должны быть обработаны как потенциальный источник инфекционных заболеваний и утилизированы в соответствии с правилами утилизации медицинских отходов, действующими на территории страны применения. В соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические

требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» Набор относится к потенциально инфицированным отходам (эпидемиологически опасные отходы, класса Б).

20. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Получение аномальных результатов при проведении исследования с помощью Набора реагентов указывает только на подозрение на заболевание, которое необходимо подтвердить другими методом. Дефицит МПО может быть подтверждён внутриклеточным окрашиванием гранулоцитов с использованием моноклональных антител к МПО (например, клон CLB-MPO-1/1, № 1F-635-T100). Дефекты НАДФН-оксидазы (ХГБ) должны подтверждаться генетическим анализом.
- Проточный цитометр необходимо регулярно калибровать с помощью флуоресцентных микрогранул для обеспечения стабильной чувствительности детекторов.
- Окрашенные пробы необходимо анализировать в стандартные временные интервалы, но не позднее чем через 2 часа после лизиса.
- Пробу крови необходимо отбирать в пробирку, содержащую гепарин. Антикоагулянты ЭДТА (двукальевая, трикальевая и динатриевая соли) и цитрат натрия оказывают негативное влияние на результаты анализа.

21. ОЦЕНКА ВЕРОЯТНЫХ СОБЫТИЙ

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор реагентов является безопасным.

Лизирующий раствор (ED7042-4) содержит формальдегид и метанол.

Опасность:



H-фразы (опасности)

H302+H312+H332: Вреден при проглатывании, контакте с кожей или вдыхании.

H317: Может вызвать аллергическую кожную реакцию.

H351: Предполагается, что вызывает рак.

P-фразы (меры предосторожности)

P270: Не есть, не пить и не курить при использовании этого продукта.

P280: Надевать защитные перчатки/защитную одежду/средства защиты глаз/средства защиты лица.

P301+P312: ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу в случае недомогания.

P302+P352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды с мылом.

P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Аккуратно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если они имеются, и если это действие легко выполнить. Продолжить промывание.

P501: Передать содержимое/контейнер в уполномоченный центр переработки опасных отходов на утилизацию.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для окружающей среды:

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор реагентов безопасен, и не является источником загрязнения окружающей среды.

Материалы, из которых изготовлен Набор реагентов, не обладают способностью образовывать токсичные соединения в воздушной среде и сточных водах в присутствии других веществ при температуре окружающей среды.

Потенциальная возможность возгорания или взрыва при использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности отсутствует.

22. СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ И УПОЛНОМОЧЕННОМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕ

Производитель

Компания «ЭКСБИО Прага, а.с.»,
(EXBIO Praha, a.s.)

Чешская Республика,

252 42 г. Вестец,

ул. Над Сафиною, II 341

Тел.: +420 261 090 666

Факс: +420 261 090 660

Эл. почта: orders@exbio.cz

Веб-сайт: <http://www.exbio.cz>

Уполномоченный представитель производителя на территории

Российской Федерации:

АО «БиоХимМак Диагностика»

Юридический адрес: 119192, г Москва, Ломоносовский проспект, дом 29, корпус 1, комната 3, этаж 1, помещение IV

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, д.1, стр.11

Телефон: 7 (495) 939-24-21; +7 (495) 932-92-14; +7 (495) 939-23-64

E-mail: info@bcmd.ru

23. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ И СВЕДЕНИЯ О РЕКЛАМАЦИЯХ

Производитель «ЭКСБИО Прага, а.с.» (EXBIO Praha, a.s.) гарантирует соответствие МИ - Набор реагентов для исследования фагоцитарной активности гранулоцитов «FagoFlowEx», установленным требованиям стандартов и документации производителя при соблюдении условий транспортирования, хранения, эксплуатации, и стабильность Набора реагентов на протяжении всего срока годности.

Срок годности Набор реагентов для исследования фагоцитарной активности гранулоцитов «FagoFlowEx» – 3 года с даты производства.

По вопросам, касающимся качества МИ - Набор реагентов для исследования фагоцитарной активности гранулоцитов «FagoFlowEx», следует обращаться к уполномоченному представителю производителя:

АО «БиоХимМак Диагностика»

Юридический адрес: 119192, г Москва, Ломоносовский проспект, дом 29, корпус 1, комната 3, этаж 1, помещение IV

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, д.1, стр.11

Телефон: 7 (495) 939-24-21; +7 (495) 932-92-14; +7 (495) 939-23-64

E-mail: info@bcmd.ru

24. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) <http://omim.org/entry/254600>.
- 2) <http://omim.org/entry/306400>.
- 3) Динауэр, М. С. Хронический гранулёматоз и прочие нарушения функции фагоцитов. Американское сообщество гематологии. Образовательная программа по гематологии 89-95 (2005). Дата издания: 10.1182/asheducation-2005.1.89.
(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).
- 4) де Оливейра младший, Е. Б., Бустаманте, Дж., Ньюбургер, П. Е. и Кондино-Нето, А. Человеческая НАДФН-оксидаза: первичные и вторичные дефекты, ухудшающие функцию респираторного взрыва и бактерицидную способность фагоцитов. Сканд. Ж. Иммунол. 73, 420-427 (2011).
(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)).
- 5) Сонг, Е и др. Хронический гранулёматоз: обзор инфекционных и воспалительных осложнений. Клиническая и молекулярная аллергия 9, 10 (2011).
(Song, E. et al. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. Clin Mol Allergy 9, 10 (2011)).
- 6) Куиджиперс, Т. и Люттер Р. Воспаления и рецидивирующие инфекции при ХГ: две стороны одной медали. Клеточные и молекулярные естественные науки 69, 7-15 (2012).
(Kuijpers, T. & Lutter, R. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. Cell. Mol. Life Sci. 69, 7-15 (2012)).
- 7) Клебанофф, С. Дж. Миелопероксидаза: друг или враг. Журнал лейкоцитарной биологии. 77, 598-625 (2005).
(Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. J. Leukoc. Biol. 77, 598-625 (2005)).

25. СИМВОЛЫ, НАНОСИМЫЕ НА УПАКОВКУ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

	Обратитесь к инструкции по применению		Изготовитель
	Код партии		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Температурный диапазон
	Номер по каталогу		Не допускать воздействия солнечного света
	Маркировка соответствия CE		Знак химической опасности: Опасность для здоровья человека
	Знак химической опасности: Восклицательный знак		

Продукт предназначен исключительно для диагностики *in vitro*.
Диагностика *in vivo* или терапевтическое применение категорически запрещены

Изделия не должны использоваться для перепродажи или передачи третьим лицам как отдельный продукт или в качестве производственного компонента другого продукта без письменного согласия EXBIO Praha, a.s. EXBIO Praha, a.s. не будет нести ответственности за нарушение патентных прав или любые другие нарушения права интеллектуальной собственности, которые могут возникнуть при использовании продуктов.



Vladimír Viklický
President & CEO

Ing. Miloslav Suchánek, Ph.D.
Vice President Business Development & Quality

Ověření - vidimace

Ověřuji, že tento opis složený z 8 listů
doslovně souhlasí s listinou, z níž byl pořízen,
složenou z 8 listů.

V Praze dne 3. 10. 2017

Mgr. Jan Dytrych
notář



Перевод с английского и чешского языков на русский язык штампов, печатей и написания фамилий и имен с указанием должностей в Инструкции по применению медицинского изделия для диагностики in vitro Набор реагентов для исследования фагоцитарной активности гранулоцитов «FagoFlowEx»

Логотип EXBIO

Печать в верхнем левом углу:

Печать: Магистр Ян Дитрих* нотариус в Праге *

Инструкция по применению медицинского изделия
для диагностики in vitro

**Набор реагентов для исследования
фагоцитарной активности гранулоцитов
«FagoFlowEx»**

Далее текст на русском языке

Печать: Магистр Ян Дитрих* нотариус в Праге *

/Подпись/

Владимир Виклицкий

Президент и Генеральный директор

/Подпись/

Инж. Милослав Сучанек, кандидат наук

Вице-президент по развитию бизнеса и качеству

Подтверждение – заверение

Настоящим удостоверяю, что это точная копия, составленная на ... листах, полностью соответствует документу, с которого она была выполнена и состоящего из ... листов.
г. Прага, 31.10.2022 г.

Магистр Ян Дитрих, нотариус

/Подпись/

Печать: Магистр Ян Дитрих* нотариус в Праге *

Переводчик

Троицкая О.Н.

Российская Федерация

Город Москва

Пятнадцатого ноября две тысячи двадцать второго года

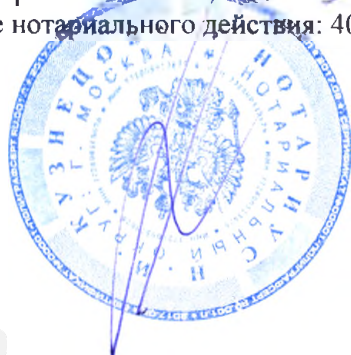
Я, Вартанова Ирина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Кузнецовой Натальи Ириковны, свидетельствую подлинность подписи переводчика Троицкой Олеси Николаевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2022-5-536

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



И.В. Вартанова

Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено

печатью 14 листов
ВРНО нотариуса Геннадия

