Zdravotni ustav se sidlem v
Doruceno: 05.05.2022
ZU/12365/2022
listy:1 prilohy.
zusoes861c9395

Příloha č. 2 zadávací dokumentace

Kupní smlouva

uzavřená na základě ustanovení § 2079 zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník, v platném znění (dále jen „smlouva")

Kupující:	**Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě**
Sídlem:	Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava, 702 00 Ostrava
Zastoupen:	Ing. Eduardem Ježem, ředitelem
IČ:	71009396
DIČ:	CZ 71009396
Státní příspěvková organizace, nezapsaná ve veřejném rejstříku	
ID datové schránky:	pubj9r8
Bankovní spojení:	ČNB
č. ú.:	3235761/0710

(dále jen jako *„kupující"*)

a

Prodávající:	EXBIO Praha, a.s.
Sídlem/místem podnikání:	Nad Safinou II 341, Vestec, 252 50
Zastoupen:	Vladimírem Viklickým, předsedou představenstva, Ing. Stanislavem Lancouchem, místopředsedou představenstva
IČ:	25548611
DIČ:	CZ699003063
zapsaný v obchodním rejstříku vedeném Krajským soudem v Praze, oddíl B, vložka: 5889	
ID datové schránky:	n5cdz7d
Bankovní spojení:	Fio banka, a.s
č. ú.:	0023 0019 4731/2010

(dále jen jako *„prodávající"*)

uzavírají níže uvedeného dne tuto kupní smlouvu v souladu se zadávací dokumentací kupujícího ze dne 21. 03. 2022, a to na základě výsledku řízení na veřejnou zakázku na dodávky s názvem **„Diagnostické soupravy pro průtokový cytometr 2022"**, zadanou v rámci DNS pod názvem: Dynamický nákupní systém na dodávky diagnostik (ev. č. ve VVZ: Z2020-009105) a podle zákona č. 134/2016 Sb. o zadávání veřejných zakázek v platném znění, a nabídkou prodávajícího ze dne 5. 4. 2022

Článek I.
Předmět a účel smlouvy

1. Předmětem této smlouvy jsou dodávky laboratorních diagnostických souprav umožňující stanovení aktivací basofilů a vyšetření fagocytární aktivity neutrofilů metodou průtokové cytometrie (dále jen „zboží") dle Přílohy č. 1 této smlouvy. Jednotlivé dílčí objednávky budou uzavírány a realizovány po dobu platnosti této smlouvy.
2. Jednotlivá plnění v rámci této smlouvy budou realizovaná formou dílčích objednávek ze strany kupujícího (dále jen „objednávka").

3. V rámci jednotlivých objednávek bude prodávající dodávat kupujícímu podle jeho konkrétních potřeb zboží specifikované dle Přílohy č. 1 této smlouvy.

4. Kupující negarantuje prodávajícímu odběr předpokládaného množství v celém rozsahu uvedeného v zadávací dokumentaci.

5. Za řádně uskutečněné dodávky se kupující zavazuje zaplatit prodávajícímu řádně a včas dohodnutou úplatu (čl. V. této smlouvy).

6. Prodávající se zavazuje dodávat kupujícímu nové, nepoškozené, nepoužité zboží.

7. Prodávající se zavazuje, že bude pro kupujícího dodávat zboží v objednaném množství a jakosti.

8. Prodávající se zavazuje kdykoliv po dobu platnosti této smlouvy, na základě žádostí kupujícího ke zboží předložit bezpečnostní listy a příbalové letáky v českém jazyce dle zákona č. 268/2014 Sb., v platném znění, a to buď v tištěné, nebo elektronické podobě.

9. Dodání předmětu plnění zahrnuje úplnou dodávku požadovaného zboží včetně příbalové informace ke zboží, dopravy na místo plnění, balného, pojistného za pojištění zboží během dopravy, celních a daňových poplatků.

10. Prodávající je povinen při plnění smlouvy postupovat s nejvyšší možnou odbornou péčí v zájmu kupujícího.

Článek II.
Objednávky v rámci smlouvy

1. Objednávka musí obsahovat minimálně označení smluvních stran, určení druhu a množství zboží a místo dodání zboží. Objednávka může obsahovat též určení doby dodání zboží. Není-li lhůta dodání určena objednávkou, sjednává se max. do 14 pracovních dnů od doručení objednávky prodávajícímu.

2. Objednávka kupujícího vyžaduje písemnou formu. Přijetí (potvrzení) objednávky prodávajícím vyžaduje taktéž písemnou formu. Písemnou formou se podle této smlouvy rozumí objednávka či její potvrzení zaslané poštou, faxem, elektronicky datovou zprávou nebo e-mailem.

3. Prodávající se zavazuje potvrdit přijetí objednávky do 2 pracovních dnů od jejího doručení. Pro případ, že prodávající nebude mít dočasně na skladě kupujícím požadované zboží, dohodly se smluvní strany, že prodávající ihned (ve lhůtě do 2 pracovních dnů) písemně vyrozumí kupujícího, kterého současně upozorní na možné prodlení s dodáním objednaného zboží (nejvýše však o 2 kalendářní týdny), přičemž prodávající kupujícímu rovněž nabídne obdobné plnění, jež je v případě písemné akceptace kupujícím schopen dodat řádně a včas.

4. Smluvní strany se dohodly, že jednotlivé dodávky zboží budou realizovány na základě konkrétních požadavků kupujícího, resp. osoby oprávněné vystavit objednávku za kupujícího, a to na dodací místa dle ust. Čl. VI. této smlouvy.

5. V případě, že prodávající nebude schopen dodávat zboží v dohodnutém množství a termínech z důvodu zásahu vyšší moci nebo všeobecných zásobovacích potíží, je prodávající povinen informovat kupujícího o uvedených skutečnostech a bude v takovém případě hledat jiné řešení dodávek zboží.

6. Všeobecnou zásobovací potíží není předem nahlášený výpadek některého zboží. V tomto případě prodávající neprodleně informuje osobu pověřenou kupujícím o této skutečnosti a po vzájemné dohodě se pokusí zajistit odpovídající množství uvedeného zboží nebo zboží zastupitelného.

Článek III.
Doba trvání smlouvy

1. Tato smlouva se uzavírá na dobu určitou, a to na **24** měsíců nebo do vyčerpání celkové ceny předmětu plnění uvedené v Čl. V. odst. 1. této smlouvy, podle toho, co nastane dříve.

2. Tato smlouva nabývá platnosti a účinnosti dnem jejího podpisu oběma smluvními stranami, nejdříve však okamžikem jejího uveřejnění v registru smluv podle zákona č. 340/2015 Sb., v platném znění.

Článek IV.
Jakost a provedení zboží

1. Dodávané zboží musí být v bezvadném stavu a jakosti, odpovídat specifikaci dle Přílohy č. 1 této smlouvy a právním předpisům, které se na zboží vztahují.

2. Kupující je oprávněn odmítnout zboží, které není v bezvadném stavu a neodpovídá specifikaci dle Přílohy č. 1 této smlouvy nebo konkrétní objednávce.

3. Prodávající se zavazuje předat kupujícímu doklady ke zboží, které se ke zboží vztahují ve smyslu § 2087 občanského zákoníku v českém jazyce (přinejmenším kupujícím potvrzený dodací list, specifikující dodanou položku zboží, její množství a cenu).

4. Prodávající prohlašuje, že zboží splňuje veškeré podmínky zákona č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích a je v souladu s Evropskou směrnicí 98/79 EC o IVD ZP, s Nařízením vlády ČR č. 56/2015 Sb., o technických požadavcích na diagnostické prostředky in vitro a nese označení CE.

5. Součástí balení zboží je příbalová informace v českém jazyce, vyznačená doba použitelnosti, číslo šarže zboží.

6. Doba použitelnosti zboží (exspirace) při jeho převzetí je min. 6 měsíců.

7. Prodávající se zavazuje balit dodané zboží obvyklým způsobem vylučujícím jeho jakékoliv poškození či jeho znehodnocení, zachovat skladovací a transportní podmínky až do převzetí dodávky v místě plnění. Kupující se dále zavazuje uchovávat dodané zboží způsobem, který jejich výrobce stanoví pro jejich úschovu a skladování.

8. Prodávající poskytuje kupujícímu na zboží záruku za jakost ve smyslu § 2113 a násl. občanského zákoníku.

Článek V.
Kupní cena a platební podmínky

1. Celková cena předmětu plnění za dobu trvání smlouvy činí 63 840,00 Kč bez DPH

(slovy šedesáttřitisícosmsetčtyřicet_korun). Sazba DPH činí 21%. Celková výše DPH činí 13 406,40Kč (slovy_třinácttisícčtyřistašet_korun_a_čtyřicet_haléřů). Celková cena předmětu plnění včetně DPH činí 77 246,40 Kč (slovy sedmdesátsedmtisícdvěstěčtyřicetšest_korun_a_čtyřicet_haléřů).

2. Jednotková cena za zboží je smluvními stranami sjednána následujícím způsobem:

   - Zboží, bude po celou dobu platnosti této smlouvy poskytováno kupujícímu za jednotkové ceny uvedené v Příloze č. 2 této smlouvy. Těmito cenami jsou smluvní strany vázány a prodávající není oprávněn tyto ceny po dobu platnosti této smlouvy měnit.

   - Na základě objednávek zaplatí kupující prodávajícímu cenu, která se vypočte v rámci příslušné objednávky dle skutečného počtu skutečně dodaného zboží v rámci příslušné objednávky, tzn., dle skutečného počtu kusů konkrétního zboží a jednotkové ceny uvedené v Příloze č. 2 této smlouvy, která je konečná, neměnná a platná po celou dobu trvání smlouvy.

3. Součástí kupní ceny a dodávky je český návod pro použití zboží, balné, doprava na místo plnění, pojistné za pojištění zboží během dopravy, celní a daňové poplatky.

4. Ke kupní ceně prodávající účtuje daň z přidané hodnoty podle právních předpisů platných v době uskutečnění zdanitelného plnění.

5. Jednotkové ceny za zboží uvedené v Příloze č. 2 této smlouvy je možné překročit pouze v závislosti se změnou daňových předpisů týkajících se DPH.

6. V případě, že dojde na trhu (během trvání smlouvy) ke snížení jednotkové ceny za zboží uvedeného v Příloze č. 1, je prodávající povinen provést snížení jednotkové ceny uvedené v Příloze č. 2 této smlouvy na srovnatelnou úroveň. Prodávající změny oznámí kupujícímu písemně.

7. Kupující zaplatí kupní cenu na základě faktury, kterou prodávající vystaví po dodání zboží na základě smlouvy. Přílohou faktury musí být dodací list potvrzený kupujícím, specifikující dodanou položku zboží, její množství a cenu. Ke každé objednávce bude vystavena samostatná faktura s uvedením čísla objednávky.

8. Faktura vystavená prodávajícím je daňovým dokladem a musí mít náležitosti daňového dokladu stanovené v zákoně č. 235/2004 Sb., o dani z přidané hodnoty, ve znění pozdějších předpisů a stanovené touto smlouvou a musí být doručena kupujícímu.

9. Faktura je splatná ve lhůtě 30 kalendářních dnů ode dne prokazatelného doručení faktury kupujícímu, není-li na faktuře vyznačena delší lhůta splatnosti.

10. Jestliže faktura nebude obsahovat náležitosti stanovené právními předpisy a touto smlouvou, nebo jestliže údaje v ní uvedené nebudou správné, budou přepisované nebo jinak opravované, je kupující oprávněn vrátit ji ve lhůtě splatnosti prodávajícímu s uvedením chybějících náležitostí nebo nesprávných údajů. V takovém případě se přeruší lhůta splatnosti a počne běžet znovu ve stejné délce doručením opravené faktury do sídla kupujícího.

11. Platba faktury se považuje za uskutečněnou odepsáním příslušné částky z účtu kupujícího.

12. V případě, že se prodávající stane nespolehlivým plátcem ve smyslu § 106a zákona č.

235/2004 Sb., o dani z přidané hodnoty, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon o DPH"), je povinen o tom neprodleně písemně informovat kupujícího. Bude-li prodávající ke dni uskutečnění zdanitelného plnění veden jako nespolehlivý plátce nebo číslo bankovního účtu prodávajícího uvedené na faktuře nebude zveřejněno způsobem umožňujícím dálkový přístup podle § 96 zákona o DPH, je kupující oprávněn část kupní ceny odpovídající dani z přidané hodnoty uhradit přímo na účet správce daně v souladu s ust. § 109a zákona o DPH. O tuto částku bude ponížena celková kupní cena a prodávající obdrží kupní cenu bez DPH. Prodávající souhlasí a bere na vědomí, že shora uvedeným postupem je zcela splněn závazek kupujícího uhradit vyfakturovanou kupní cenu. V případě, že z důvodu porušení povinností vyplývajících ze zákona o DPH prodávajícím bude kupující jako ručitel vyzván příslušným správcem daně k zaplacení dlužné částky DPH za prodávajícího, a to z jakéhokoliv důvodu, a tuto dlužnou částku DPH za něj uhradí, zavazuje se prodávající uhradit kupujícímu tuto dlužnou částku do 30 dní ode dne, kdy k tomu bude ze strany kupujícího písemně vyzván. V případě, že se prodávající stane nespolehlivým plátcem ve smyslu tohoto odstavce, má kupující současně právo od této smlouvy odstoupit s účinky do budoucna.

13. Kupující neposkytuje zálohy.

Článek VI.
Místo plnění

1. Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava, 702 00 Ostrava, Centrum klinických laboratoří.

Článek VII.
Nebezpečí škody na zboží a vlastnické právo

1. Prodávající prohlašuje, že zboží je výhradně jeho vlastnictvím, není předmětem zástavy ani jiného závazku a že mu není známo, že by zboží bylo zatíženo jakýmikoliv právy třetích osob.
2. Riziko ztráty, zničení nebo poškození dodávaného zboží nese do okamžiku jeho převzetí prodávající.
3. Nebezpečí škody na zboží a vlastnické právo přechází na kupujícího převzetím zboží.

Článek VIII.
Odpovědnost za vady

1. Kupující je povinen vady zboží, které zjistil při prohlídce zboží (neodpovídající doba použitelnosti zboží-exspirace, nekompletnost dodávky, zjevné vady zboží atp.), oznámit prodávajícímu bez zbytečného odkladu písemně poté, kdy je zjistil, nejpozději však do uplynutí doby použitelnosti (exspirace) zboží.
2. Prodávající je povinen zboží s vadami bez zbytečného odkladu po jejich oznámení vyměnit a dát kupujícímu zboží bezvadné. V případě, že to není možné, vrátí kupující prodávajícímu zboží oproti dobropisu.
3. Kupující má právo také na odstranění vad vzniklých po převzetí zboží kupujícím, pokud je prodávající způsobil porušením své povinnosti. Projeví-li se vada v průběhu

6 měsíců od převzetí zboží, má se za to, že dodaná věc byla vadná již při převzetí.

4. Kupující má právo na úhradu nutných nákladů, které mu vznikly v souvislosti s uplatněním práva z odpovědnosti prodávajícího za vady.

Článek IX.
Prodlení s dodáním zboží

1. V případě prodlení prodávajícího s dodáním objednaného zboží oproti termínu dle ust. Čl. II. odst. 1 této smlouvy je prodávající povinen zaplatit kupujícímu smluvní pokutu ve výši 0,1 % z kupní ceny objednaného zboží, s jehož dodáním se prodávající dostal do prodlení, a to za každý, byť i jen započatý den prodlení.

2. Pro případ nekompletní dodávky, nebo není-li dodáno zboží správně podle objednávky, sjednává se smluvní pokuta ve výši 500,- Kč za každé takovéto porušení, kterou je povinen uhradit prodávající kupujícímu. Tato sankce se neuplatňuje v případě, že nekompletnost dodávky byla kupujícím doložitelně akceptována.

3. Smluvní strany se dohodly, že závazek zaplatit smluvní pokutu nevylučuje právo na náhradu škody.

Článek X.
Ostatní ujednání

1. V případě, že se kupující dostane do prodlení s úhradou faktury, má prodávající právo požadovat úrok z prodlení pouze v zákonné výši dle nařízení vlády č.351/2013 Sb., v platném znění.

Článek XI.
Závěrečná ustanovení

1. Vztahy účastníků z této smlouvy se řídí příslušnými ustanoveními zákona č.89/2012 Sb., občanský zákoník.

2. Smluvní strany na sebe přebírají nebezpečí změny okolností v souvislosti s právy a povinnostmi smluvních stran vzniklými na základě této smlouvy. Smluvní strany vylučují uplatnění ust. § 1765 odst. 1 a § 1766 občanského zákoníku na svůj smluvní vztah založený smlouvou.

3. Tuto smlouvu lze změnit nebo zrušit jen písemně, nevyplývá-li z jejích ustanovení něco jiného.

4. Kupující má právo tuto smlouvu vypovědět s výpovědní lhůtou jednoho měsíce, která počíná běžet prvním dnem kalendářního měsíce následujícího po kalendářním měsíci, v němž byla výpověď doručena druhé smluvní straně, jestliže:

   a) Prodávající opakovaně (nejméně třikrát) nepotvrdí přijetí objednávky ve lhůtě stanovené dle ust. Čl. II. odst. 3. této smlouvy; nebo

   b) Prodávající opakovaně (nejméně třikrát) nedodá zboží dle objednávky ve lhůtě stanovené dle ust. Čl. II. odst. 1 této smlouvy.

5. Prodávající má právo tuto smlouvu vypovědět s výpovědní lhůtou dvou měsíců, která počíná běžet prvním dnem kalendářního měsíce následujícího po kalendářním měsíci, v němž byla výpověď doručena druhé smluvní straně v případě, že kupující bude v prodlení s úhradou řádně vystavené a doručené faktury za dodané dodávky zboží delší než 30 dní od uplynutí lhůty splatnosti takové faktury a k úhradě nedojde ani po písemné výzvě prodávajícího.

6. Tuto smlouvu může vypovědět i kterákoliv ze smluvních stran i bez uvedení důvodu s výpovědní lhůtou dvou měsíců, která počíná běžet prvním dnem kalendářního měsíce následujícího po kalendářním měsíci, v němž byla výpověď doručena druhé smluvní straně.

7. Tato smlouva může být měněna pouze písemně, přičemž za písemnou formu nebude pro tento účel považována výměna e-mailových či jiných elektronických zpráv.

8. Případné spory z této smlouvy se smluvní strany zavazují přednostně řešit smírnou cestou. Nebude-li takto dosaženo vzájemné dohody, je kterákoli ze smluvních stran oprávněna obrátit se na věcně a místně příslušný soud České republiky.

9. Prodávající dále souhlasí a je srozuměn se skutečností, že kupující může být na základě zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů a zákona č. 340/2015 Sb., o registru smluv, povinen uveřejnit tuto smlouvu v registru smluv nebo o této smlouvě a právním vztahu jí založeném zpřístupnit či poskytnout všechny informace, které citované zákony nebo jiné právní předpisy z uveřejnění nebo zpřístupnění nevylučují.

10. Smluvní strany se shodují, že zveřejnění této smlouvy v registru smluv podle zákona č. 340/2015 Sb., zajistí kupující.

11. Kontaktní osoby:

    Za kupujícího je oprávněn jednat:

    [redacted]

    Ve věci objednávek:

    [redacted]

    Za prodávajícího je oprávněn jednat:

    [redacted]

    Ve věci objednávek:

    [redacted]

12. Tato smlouva je vyhotovena ve stejnopise v elektronické podobě.

13. Nedílnou součástí této smlouvy jsou:
    - Příloha č. 1 Specifikace nabízených diagnostických souprav
    - Příloha č. 2 Jednotková cena zboží.

14. Smluvní strany podpisem smlouvy prohlašují, že se s obsahem této smlouvy seznámily a bez výhrad s ní souhlasí.

V Ostravě dne:

za kupujícího:

Ing. Eduard Ježo

Digitálně podepsal Ing. Eduard Ježo
Datum: 2022.05.05 22:08:46 +02'00'

Ing. Eduard Ježo
ředitel Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě

V ....., dne:

za prodávajícího:

[redacted]

Datum: 2022.05.04 11:16:31 +02'00'

[redacted]

Datum: 2022.05.04 11:31:28 +02'00'

Příloha č. 1 **Specifikace nabízených diagnostických souprav**

Název: BasoFlowEx Kit
Kat.č. ED7043

Název: FagoFlowEx Kit
Kat.číslo: ED7042

Viz.následující datasheety

BasoFlowEx Kit

Kat.č. ED7043

1. Určený účel prostředku

Účel použití

BasoFlowEx Kit je určený pro **testování alergické reakce zprostředkované protilátkami IgE** analýzou expozice proteinu CD63 na povrchu bazofilů po jejich stimulaci alergenem v lidské periferní krvi s heparinem pomocí průtokové cytometrie. Stimulaci je možné provádět pomocí komerčně dostupných alergenů.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Klíčovým bodem v diagnostice alergií je co nejpřesnější stanovení příčinného alergenu. Běžně užívaná metoda kožních prick testů (SPT) se vyznačuje nízkou spolehlivostí, a kromě toho může u pacientů vyvolat zhoršení alergického onemocnění. Proto je žádoucí využívat testy *in vitro*, jako je detekce specifických protilátek IgE v séru (sIgE) či analýza aktivačních markerů bazofilů. Specificita stanovení sIgE je v případě většiny alergenů dostatečně vysoká, ale senzitivita bývá pouze kolem 75%, kromě toho u některých alergenů (zejména potravin a léků) je senzitivita i specificita detekce sIgE podstatně nižší. Oproti tomu se test aktivace bazofilů (BAT) vyznačuje nejen velmi vysokou specificitou, ale i vysokou senzitivitou, a to i v případě řady problematických antigenů.

2. Princip testu

Principem testu je vyvolání aktivace bazofilů *in vitro* v přítomnosti senzibilizujícího alergenu a následné měření expozice aktivačního znaku bazofilů (proteinu CD63) na buněčném povrchu pomocí monoklonální protilátky metodou průtokové cytometrie. Pokud je ve vzorku přítomno dostatečné množství alergenně specifických molekul IgE, které jsou navázané na povrchu bazofilů prostřednictvím vysoko-afinitního receptoru FcγRI, přidaný alergen způsobí přemostění receptorů, které vede k plné aktivaci bazofilů spojené s procesem vylití obsahu zánětlivých mediátorů z cytoplazmatických granulí vně buňky (degranulaci). Degranulace má mimo jiné za následek expozici transmembránového proteinu cytoplazmatických granulí CD63 na povrch bazofilů. Ten je následně detekován monoklonální protilátkou anti-CD63 (klon MEM-259) konjugovanou s FITC. Populace bazofilů je ve směsi leukocytů identifikována monoklonální protilátkou anti-CD203c (klon NP4D6) konjugovanou s PE. Pozitivní kontrolu představuje vzorek, ve kterém jsou bazofily aktivované monoklonální protilátkou anti-IgE, která zastupuje stimulační účinek specifického alergenu, a chemotaktickým peptidem N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), který aktivuje bazofily přes fMLP receptor (FPR1).

3. Poskytované materiály

ED7043-1 **Stimulation Buffer** – 5 kusů vialek obsahujících lyofilizovaný stimulační pufr, jedna vialka je určená pro stimulaci 20 zkumavek.
ED7043-2 **Stimulation Control** – 2 kusy vialek obsahujících lyofilizovaný stimulant pozitivní kontroly, jedna vialka je určená pro stimulaci 25 pozitivních kontrolních vzorků.
ED7043-3 **Staining Reagent** – 1 vialka obsahující 2 ml koktejlu protilátek: anti-CD63 značená FITC + anti-CD203c značená PE.
ED7043-4 **Lysing Solution** – lahvička s lyzačním roztokem, 30 ml.

4. Nutné, ale neposkytované materiály

Alergeny
5ml zkumavky pro barvení buněk (12 × 75 mm)
Fosfátový pufr (PBS)
Ultračistá demineralizovaná voda

5. Nutná zařízení

Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
Vortex
Termostat umožňující inkubovat zkumavky při 37 °C
Centrifuga s rotorem pro zkumavky
Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC) a při 575 nm (PE)

6. Skladování a manipulace

BasoFlowEx Kit skladujte při teplotě 2-8 °C. Soupravu je nutno chránit před slunečním zářením. Doba použitelnosti je vyznačena na jednotlivých reagenciích i na krabici soupravy. Informace o skladování rekonstituovaných reagencií jsou uvedeny v oddíle 9.

7. Výstrahy, předběžná opatření a omezení

- Souprava je určena pro In vitro diagnostiku v laboratořích mimo USA a Kanadu. Souprava je ve shodě s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.
- Nepoužívejte reagencie po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Vzroky krve jsou považovány za potenciálně infekční materiál, pracujte výhradně v ochranných rukavicích a při práci dodržujte správné postupy pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem.
- Staining Reagent (ED7043-3) nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Reagencie Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje formaldehyd a metanol.

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 nejezte, 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 KŮŽÍ: 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.

- Úplné informace o potenciálních nebezpečích a bezpečném způsobu práce s výrobkem najdete v bezpečnostním listu produktu.
- Vzorek krve může obsahovat nedostatečné množství bazofilů pro provedení testu.
- Některé vzorky krve mohou obsahovat bazofily, které nejsou stimulovatelné.
- Kvalita použitého stimulačního alergenu ovlivňuje spolehlivé provedení testu.
- Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není pravidelně kalibrován a udržován.
- Pokud nejsou fluorescenční signály správně kompenzovány nebo nejsou správně umístěny regiony (gate) pro pozitivní a negativní buňky, pak mohou být data nesprávně interpretována.
- Vzorky analyzujte nejpozději do 2 hodin po obarvení.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nedodržení doporučeného postupu měření a analýzy může ovlivnit výsledky testů.

8. Vzorek

Vyšetření se provádí na krvi odebrané do zkumavky s heparinem.
Krev musí být odebrána do zkumavky s heparinem. Postupujte podle pokynů výrobce zkumavky a ujistěte se, že je dosaženo správného plnícího objemu krve.
Antikoagulanty EDTA a citrát ruší analýzu.
Vzorky krve skladujte při laboratorní teplotě.
Vzorky krve zpracujte nejdéle do 8 hodin po odběru za předpokladu, že jsou skladovány za laboratorní teploty.
Během barvení vzorků chraňte obsah zkumavek před kontaminací vzdušnými alergeny (pyly, prachové částice), které mohou falešně zvýšit počet aktivovaných bazofilů

9. Postup

Příprava reagencií

1. Lyofilizovaný stimulační pufr (**Stimulation Buffer**) před použitím rekonstituujte pomocí 2 ml demineralizované vody. Nespotřebované množství stimulačního pufru je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle 5 dní, případně zamrazit při ≤ -20 °C po vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.
2. Lyofilizovaný stimulant pozitivní kontroly (**Stimulation Control**) před použitím rekonstituujte pomocí 0,25 ml demineralizované vody. Nespotřebované množství stimulantu je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle 30 dní, případně zamrazit při ≤ -20 °C po vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.
3. Ostatní reagencie (**Staining Reagent, Lysing Solution**) jsou připravené pro okamžité použití.

Postup zkoušky

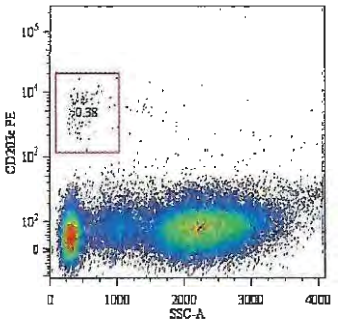
Pro vyšetření jednoho vzorku krve je třeba připravit **negativní kontrolu, pozitivní kontrolu** a **potřebný počet zkumavek stimulovaných testovanými alergeny.** Pro stimulaci je možné použít různé komerční alergeny. Vzorky připravte podle následujícího postupu:

1. Do zkumavek určených pro:
   - **alergenem stimulovaný vzorek** napipetujte 10 µl alergenu,
   - **negativní kontrolní vzorek** nepipetujte nic,
   - **pozitivní kontrolní vzorek** napipetujte 10 µl rekonstituovaného stimulantu (Stimulation Control).
2. Do všech zkumavek napipetujte 100 µl rekonstituovaného stimulačního pufru (Stimulation Buffer).
3. Do všech zkumavek napipetujte 100 µl krve s heparinem a zkumavky promíchejte pomocí vortexu.
4. Zkumavky inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 15 minut ve vodní lázni nebo 25 minut v inkubátoru.
5. Poté do všech zkumavek napipetujte 20 µl koktejlu protilátek (Staining Reagent), zkumavky promíchejte pomocí vortexu a inkubujte 20 minut v lednici při 2-8 °C nebo na ledu.
6. Poté přidejte 300 µl lyzačního roztoku (Lysing Solution), zkumavky promíchejte pomocí vortexu a inkubujte 5 minut při laboratorní teplotě.
7. Do zkumavek přidejte 3-4 ml demineralizované vody, promíchejte pomocí vortexu a inkubujte přibližně 5-10 minut při laboratorní teplotě, dokud nedojde k lyzi červených krvinek.
8. Centrifugujte zkumavky 5 minut při 300 g.
9. Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 0,2-0,4 ml pufru PBS.
10. Vzorky změřte průtokovým cytometrem nejpozději do 2 hodin od obarvení.

Analýza v průtokovém cytometru

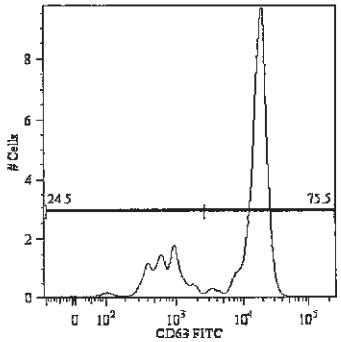
Obarvené vzorky analyzujte průtokovým cytometrem. Jelikož by mělo být analyzováno minimálně 200 bazofilů, změřte cytometrem 50 000-10 0000 událostí od každého vzorku. Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat (FITC a PE kanál).
Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus intenzita fluorescence v PE kanálu (FL2) a ohraničte vhodným regionem populaci bazofilů, které jsou CD203c pozitivní ($CD203c^{pos}$) a mají nízký SSC (SSC^{low}), jak je znázorněno na obrázku 1 (kvůli odlišné expresi CD203c u nestimulovaného a stimulovaného vzorku je třeba umístění regionu upravit pro každý vzorek zvlášť).

Obr. 1 Ohraničení populace bazofilů ($CD203c^{pos}$ / SSC^{low}).

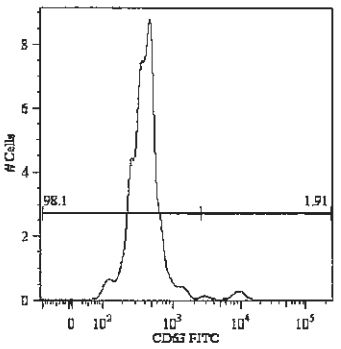


Poté zobrazte ohraničené bazofily v histogramu, kde na ose X je vynesena intenzita fluorescence ve FITC kanálu (FL1), jak je znázorněno na obrázcích 2a,b,c. Pomocí negativní kontroly nastavte region odpovídající $CD63^{dim}$ populaci, která představuje neaktivované bazofily. Poté spočítejte procentuelní zastoupení aktivovaných bazofilů, které jsou $CD63^{bright}$, v jednotlivých alergenem stimulovaných vzorcích a u pozitivní kontroly.

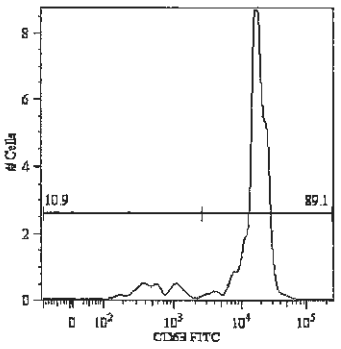
Obr. 2a Histogram populace bazofilů po stimulaci alergenem.



Obr. 2b Histogram populace bazofilů negativní kontroly.



Obr. 2c Histogram populace bazofilů pozitivní kontroly.



Výpočty a interpretace výsledků

Vypočítejte procento aktivovaných bazofilů ($CD63^{bright}$) ve vzorcích stimulovaných alergenem a ve vzorku pozitivní kontroly.
Při hodnocení testu je třeba brát v úvahu hranici pozitivity testu pro jednotlivé skupiny alergenů, kterou by si měla ustanovit každá laboratoř. Hraniční hodnota pozitivity testu bývá obyčejně nastavena následovně:

inhalační a potravinové alergeny	≥15 %
jed blanokřídlého hmyzu	≥10 %
léky	≥5 %

Hodnocení testu není možné provést, pokud pozitivní kontrola vykazuje méně než 20 % aktivovaných bazofilů.

10. Vlastnosti analytické funkce

Přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost)

Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření byla stanovena duplicitním měřením šesti sensitizujícími alergeny nezávisle pěti operátory na jednom vzorku krve za stejných experimentálních podmínek. Metodou analýzy rozptylů byly stanoveny následující parametry opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření:

$CV_{opakovatelnost}$ = 2,4 %
$CV_{reprodukovatelnost}$ = 3,4 %

11. Vlastnosti klinické funkce

Specificita a Citlivost

Specificita a Citlivost metody byla stanovena srovnávacím měřením soupravy BasoFlowEx Kit se dvěma komerčně dostupnými BAT soupravami (A, B). Srovnání bylo provedeno v rutinním provozu klinické laboratoře na 100 vzorcích.

Parametr	BasoFlowEx vs. Souprava A	BasoFlowEx vs. Souprava B	Souprava B vs. Souprava A
Citlivost (%)	96,6	85,9	94,7
Specificita (%)	82,9	79,3	69,2

Očekávané hodnoty

Průměrná hodnota počtu aktivovaných bazofilů změřených v pozitivních kontrolách 20 krevních vzorků je uvedena v následující tabulce. Počet aktivovaných bazofilů u vzorků stimulovaných alergenem se může teoreticky pohybovat v rozmezí 0-100 %.

Parametr	Průměr (%)	SD	CV (%)
Aktivované bazofily	77,3	19,4	25,1

12. Odkazy

1. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Vallon C, Guerin JC (1998) Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. Inflamm Res. 47(10): 401-408

2. Sanz ML, Sánchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, Diéguez I, De Weck AL (2001) Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus and Lolium perenne. Clin. Exp. Allergy 31(7): 1007-1013

3. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Slodowy S, Merk HF, Sachs B (2003) CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. Clin. Exp. Allergy 33(5): 607-614

4. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ (2004) In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? Clin. Exp. Allergy 34(3): 332-339

5. Valent P, Hauswirth AW, Natter S, Sperr WR, Bühring HJ, Valenta R (2004) Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. Methods 32(3): 265-270

13. Výrobce

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

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

14. Ochranné známky

n/a

15. Historie revizí

• Verze 1, ED7043_IFU_v1
První vydání.
• Verze 2, ED7043_IFU_v2
Změna textu v sekci Upozornění: Text „Souprava je určená pro profesionální uživatele" odstraněno a nahrazeno „Souprava je určena pro In vitro diagnostiku a vyhovuje požadavkům NV 453/2004 Sb., které je harmonizováno s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC".
• Verze 3, ED7043_IFU_v3
Varovný text byl změněn z „reagencie Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje < 5% formaldehydu" na „reagencie Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje formaldehyd a methanol".
R- a S-věty a symboly nebezpečnosti byly změněny na H- a P-věty a GHS symboly podle nařízení (ES) č. 1272/2008.
• Verze 4, ED7043_IFU_v4
Text „(např. určených pro kožní testy)" byl odstraněn z části Použití soupravy.
Text „(např. pro kožní testy)" byl odstraněn z části Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván.
Text „např.: vhodně ředěné (1-10x) alergeny používané pro kožní testy" byl odstraněn z části Postup testu.
• Verze 5, ED7043_IFU_v5
Změna loga výrobce a vzhledu Návodu k použití.
Přidáno omezení pro skladování: "Chránit před slunečním zářením".
Do sekce Vzorek byl přidán text „Postupujte podle pokynů výrobce zkumavky a ujistěte se, že je dosaženo správného plnícího objemu krve".
Do oddílu Skladování a manipulace byl přidán text „Informace o skladování rekonstituovaných reagencií jsou uvedeny v oddíle 9".
Změna PSČ výrobce z 25242 na 25250.
V sekci „Výstrahy, předběžná opatření a omezení" byl přidán text „Úplné informace o potenciálních nebezpečích a bezpečném způsobu práce s výrobkem najdete v bezpečnostním listu produktu."
• Verze 6, ED7043_IFU_v6
Byl upřesněn text definující omezení použití produktu.

exbio

BasoFlowEx Kit

100 testů | Kat.č. **ED7043**

IVD CE

Návod k použití

Verze ED7043_IFU_v6_CS
Datum vydání: 20-01-2020

CS

Symboly

REF	Katalogové číslo
LOT	Kód dávky
	Použít do data
	Omezení teploty
	Chránit před slunečním zářením
IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*
CE	Označení shody CE
	Čtěte návod k použití
	Výrobce

Produkt je určen pro In Vitro diagnostické použití. In vivo diagnostické nebo terapeutické aplikace jsou zakázány.
Výrobky nesmějí být použity k dalšímu prodeji nebo převodu třetím osobám ani jako samostatný výrobek, ani jako součást výroby jiného výrobku bez písemného souhlasu EXBIO Praha, a.s.
EXBIO Praha, a.s. nenese odpovědnost za porušení patentu ani za žádné další porušení práv duševního vlastnictví, ke kterým může dojít při používání těchto produktů. Objednávky na všechny produkty jsou přijímány v souladu s pravidly a podmínkami dostupnými na www.exbio.cz. EXBIO, EXBIO Logo a všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti EXBIO Praha, a.s.

FagoFlowEx Kit

Kat.č. ED7042

1. Určený účel prostředku

Účel použití

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.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

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 plísně), 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^{phox} podjednotku flavocytochrome b_{558}, který je lokalizován na chromozomu X[4,5]. Aktivní NADPH oxidáza zdravého jedince katalyzuje reakci NADPH s kyslíkem a produkuje $NADP^+$ a superoxidový radikál $O_2^{\bullet-}$, který prochází další řadou reakcí vedoucí k produkci singletového kyslíku a peroxidu vodíku, který je dále transformován myeloperoxidázou. Pacienti s CGD trpí zápalem plic, abscesy na kůži, tkáních a orgánech, hnisavou artritidou, osteomyelitidou, bakteriemií / fungemií a povrchovými kožními infekcemi, jako je celulitida nebo impetigo[6]. Přetrvávající infekce může vést k tvorbě tkáňových granulomů na základě přílišné produkce TNF a IFNγ cytokinů $CD4^+$ 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 chlornanu z peroxidu vodíku enzymem myeloperoxidázou. Chlornan je považován za hlavní zabíječ patogenů při respiračním vzplanutí [8].

Enzym G6PD se účastní dráhy hexóza monofosfátu, tedy jednoho z hlavních procesů tvorby NADPH. Snížená 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.

2. Princip testu

Principem testu je měření respiračního vzplanutí neutrofilních granulocytů po stimulaci bakteriemi *E. coli*. Při ingesci 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 meziprodukty 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 v granulocytech i bez ingesce bakterií.

3. Poskytované materiály

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

4. Nutné, ale neposkytované materiály

Vhodné 5ml zkumavky (12 x 75 mm)
Ultračistá demineralizovaná voda

5. Nutná zařízení

Automatické pipety s jednorázovými špičkami
Vortex
Termostat umožňující inkubovat při 37 °C nebo vodní lázeň
Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC)

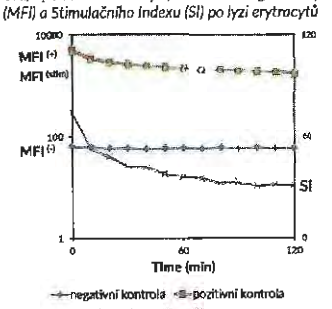
6. Skladování a manipulace

FagoFlowEx Kit skladujte při teplotě 2-8 °C. Chraňte před přímým slunečním svitem. Doba použitelnosti je vyznačena na jednotlivých reagenciích i na krabici soupravy.
Informace o skladování rekonstituovaných reagencií jsou uvedeny v oddíle 9.

7. Výstrahy, předběžná opatření a omezení

- Souprava je určena pro In vitro diagnostiku v laboratořích mimo USA a Kanadu. Souprava je ve shodě s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.
- Nepoužívejte reagencie po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Reagencii DHR123 (ED7042-2) nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Vzroky krve jsou považovány za potenicálně infekční materiál, pracujte výhradně v ochranných rukavicích a při práci dodržujte správné postupy pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem.
- Lysing Solution (ED7042-4) obsahuje formaldehyd a metanol.
  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 nejezte, 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 KŮŽÍ: 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.
- Úplné informace o potenciálních nebezpečích a bezpečném způsobu práce s výrobkem najdete v bezpečnostním listu produktu.
- Obarvené vzorky analyzujte nejpozději 2 hodiny po lyzi, ve standardizovaném časovém rámci (viz graf).

Graf poklesu intenzity fluorescence granulocytů (MFI) a Stimulačního Indexu (SI) po lyzi erytrocytů



- Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není pravidelně kalibrován a udržován.
- Nedodržení doporučeného postupu analýzy může ovlivnit výsledky testů.

8. Vzorek

Vyšetření se provádí na krvi odebrané do zkumavky s heparinem.
Krev musí být odebrána do zkumavky s heparinem. Postupujte podle pokynů výrobce zkumavky a ujistěte se, že je dosaženo správného plnícího objemu krve.
Antikoagulanty EDTA a citrát ruší analýzu.
Krev v odběrových zkumavkách musí být skladována za laboratorní teploty na kývačce.
Vzorky krve zpracujte nejdéle do 24 hodin po odběru.

9. Postup

Příprava reagencií

1. Lyofilizované bakterie *E. coli* rekonstituujte pomocí 250 µl demineralizované vody a suspenzi promíchejte vortexem.
   Nespotřebované množství suspenze je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle 24 hodin, případně zamrazit při ≤ -20 °C. Zmrazené *E. coli* zpracujte do 7 dnů. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování.
2. Lyofilizovaný DHR123 rekonstituujte pomocí 650 µl demineralizované vody. Roztok mírně promíchejte, nevortexujte.
   Nespotřebované množství roztoku je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle 8 hodin, případně zamrazit při ≤ -20 °C. Zmrazený DHR123 spotřebujte do 7 dnů. Reagencie vydrží až 5 cyklů zmrazení a rozmrazení. Skladování zamraženého roztoku může způsobit až 20% pokles stimulačních indexů.
3. Lyofilizovanou reagencii Stimulation Control rekonstituujte v 250 µl demineralizované vody a roztok promíchejte vortexem.
   Nespotřebované množství roztoku je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle 24 hodin, případně zamrazit při ≤ -20 °C. Zmrazenou reagencii zpracujte do 7 dnů. Reagencie vydrží až 5 cyklů zmrazení a rozmrazení.
4. Lyzační roztok (Lysing Solution) je připraven pro okamžité použití.

Postup zkoušky

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

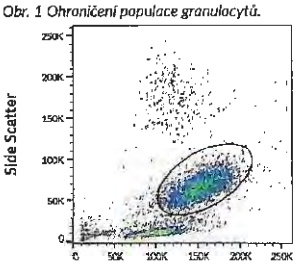
1. Do zkumavek určených pro:
   - **vzorek stimulovaný bakteriemi:** napipetujte 10 µl suspenze *E. coli*,
   - **negativní kontrolní vzorek:** nepipetujte nic,
   - **pozitivní kontrolní vzorek:** napipetujte 10 µl roztoku Stimulation Control.
2. Do všech zkumavek napipetujte 50 µl krve s heparinem 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.

Analýza v průtokovém cytometru

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.

Obr. 1 Ohraničení populace granulocytů.



Vlivem ingesce 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. Vhodně umístěnými regiony (gate) spočítejte procentuální 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.

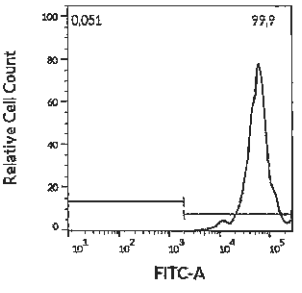
Výpočty a interpretace výsledků

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

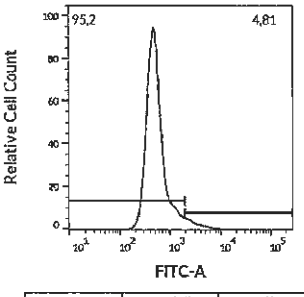
a) **Procentuální zastoupení pozitivních granulocytů**, které vykazují respirační vzplanutí po stimulaci bakteriemi *E. coli*.

b) **Stimulační index**, který představuje poměr MFI pozitivních granulocytů stimulovaného vzorku a MFI negativních granulocytů negativního kontrolního vzorku (viz dole příklad výpočtu Stimulačního Indexu). Stimulační index slouží pro přibližné porovnání intenzity respiračního vzplanutí mezi jednotlivými vzorky krve.

Obr. 2a Histogram granulocytů pozitivní kontroly.

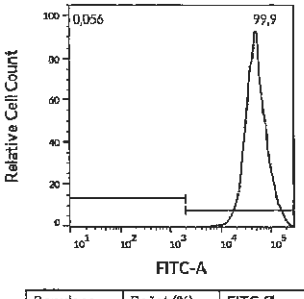


Obr. 2b Histogram granulocytů negativní kontroly.



Populace	Počet (%)	FITC Ø
negativní	95.2	550
pozitivní	4.81	3995

Obr. 2c Histogram stimulovaných granulocytů.



Populace	Počet (%)	FITC Ø
negativní	0.056	1224
pozitivní	99,9	53836

Příklad výpočtu hodnoty Stimulačního Indexu
Hodnoty průměrné fluorescence z Obr. 2b a 2c:
Stimulační index = 53836 / 550 = 98

10. Vlastnosti analytické funkce

Přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost)

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 stimul. granulocytů
$CV^{opakovatelnost} = 1,4\ \%$
$CV^{reprodukovatelnost} = 3,2\ \%$

b) Pro stanovení stimulačního indexu granulocytů
$CV^{opakovatelnost} = 12,2\ \%$
$CV^{reprodukovatelnost} = 13,6\ \%$

Opakovatelnost i reprodukovatelnost měření stimulačního indexu je silně závislá na dodržování inkubačních časů, inkubační teploty a na preciznosti pipetování.

11. Vlastnosti klinické funkce

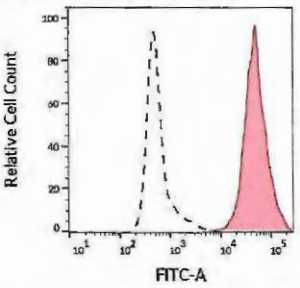
Očekávané hodnoty

Normální hodnoty fagocytární aktivity granulocytů byly stanoveny na čerstvých vzorcích periferní krve 40 zdravých jedinců.

- Počet granulocytů s respiračním vzplanutím 90-100 %
- Stimulační index granulocytů > 30
  3. percentil = 31
  Medián = 52
  97. percentil = 93

Stimulační index je ovlivněn experimentálními podmínkami v laboratoři a nastavením průtokového cytometru. Každá laboratoř si proto musí ustanovit vlastní rozsah normálních hodnot stimulačních indexů.

Obr. 3 Překrytí histogramů: Dárce bez poruchy respiračního vzplanutí, (SI = 98).

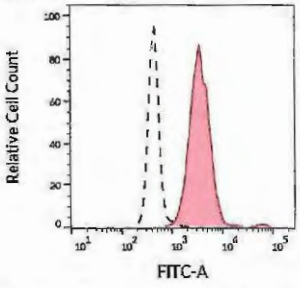


Abnormální výsledky (potenciální defekty respiračního vzplanutí)

1) Nízký stimulační index

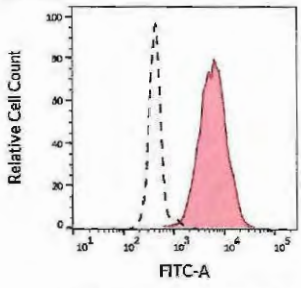
a) Pokud stimulované granulocyty vykazují sníženou intenzitu respiračního vzplanutí, může být příčinou **nepřítomnost funkčního enzymu myeloperoxidázy (MPO)** ve fagocytech. Porucha se projevuje poklesem stimulačního indexu přibližně na 1/10 normálních hodnot (Obr. 4).

Obr. 4 Překrytí histogramů: Pacient s defektem myeloperoxidázy, (SI = 11).

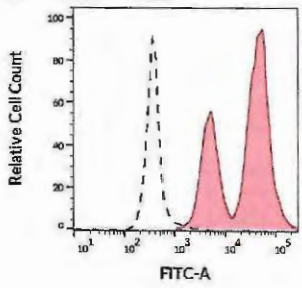


b) Méně častou příčinou poruchy, která se projevuje sníženým nebo žádným respiračním vzplanutím stimulovaných granulocytů, je závažné onemocnění **chronická granulomatóza** (CGD) spojené s poruchou kaskády NADPH oxidázy (Obr. 5).

Obr. 5 Překrytí histogramů: Pacient-muž s CGD, (SI = 16).



Obr 6. Překrytí histogramů: Pacientka-přenašečka X-vázané formy CGD, s mutací v genu pro NADPH oxidázu. V grafu jsou dvě subpopulace granulocytů lišící se v intenzitě respiračního vzplanutí, (SI^{low} = 13,9, SI^{high} = 125).



Intenzita snížení stimulačního indexu u této poruchy závisí na povaze mutace. Pokud stimulované granulocyty vykazují **dvě oddělené subpopulace** lišící se intenzitou respiračního vzplanutí (Obr. 6), 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.

c) Sníženou intenzitu 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.

Rušivé látky a omezení

Antikoagulanty EDTA a citrát ruší analýzu.
Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není pravidelně kalibrován a udržován.

12. Odkazy

1. http://omim.org/entry/254600
2. http://omim.org/entry/306400
3. http://omim.org/entry/305900
4. Dinauer MC. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:89-95.
5. de Oliveira-Junior EB. Scand J Immunol. 2011;73(5):420-7.
6. Song E. Clin Mol Allergy. 2011; 31;9(1):10.
7. Kuijpers T. Cell Mol Life Sci. 2012;69(1):7-15.
8. Klebanoff SJ. J Leukoc Biol. 2005;77(5):598-625.
9. van Bruggen R. Blood. 2002;100(3):1026-30.

13. Výrobce

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

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

14. Ochranné známky

n/a

15. Historie revizí

- Verze 1, ED7042_IFU_v1
  První vydání.
- Verze 2, ED7042_IFU_v2
  V anglické verzi přidán text: "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".
- Verze 3, ED7042_IFU_v3
  Nově byly použity GHS symboly, H- a P- věty.
- Verze 4, ED7042_IFU_v4
  Změna v rekonstituování DHR123, přidána věta: "Roztok mírně promíchejte, nevortexujte."
- Verze 5, ED7042_IFU_v5
  Změna PSČ výrobce z 25242 na 25250. Centrifuga s rotorem pro zkumavky vynechána z oddílu "Nutné, ale neposkytované materiály".
- Verze 6, ED7042_IFU_v6
  Změna loga výrobce a vzhledu Návodu k použití. Přidáno omezení pro skladování: "Chránit před slunečním zářením". Přidán text "Postupujte podle pokynů výrobce zkumavky a ujistěte se, že je dosaženo správného plnícího objemu krve." k popisu vzorku. Doplněna stabilita při používání a Graf závislosti MFI a SI na čase po lyzi erytrocytů. Přidány další parametry rozdělení (medián, percentily) pro očekávané hodnoty.
- Verze 7, ED7042_IFU_v7
  Byl upřesněn text definující omezení použití produktu.

exbio

FagoFlowEx Kit

100 testů | Kat.č. **ED7042**

IVD CE

Návod k použití

Verze ED7042_IFU_v7_CS
Datum vydání: 21-01-2020

CS

Symboly

REF	Katalogové číslo
LOT	Kód dávky
	Použít do data
	Omezení teploty
	Chránit před slunečním zářením
IVD	Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*
CE	Označení shody CE
	Čtěte návod k použití
	Výrobce

Produkt je určen pro In Vitro diagnostické použití. In vivo diagnostické nebo terapeutické aplikace jsou zakázány.
Výrobky nesmějí být použity k dalšímu prodeji nebo převodu třetím osobám ani jako samostatný výrobek, ani jako součást výroby jiného výrobku bez písemného souhlasu EXBIO Praha, a.s.
EXBIO Praha, a.s. nenese odpovědnost za porušení patentu ani za žádné další porušení práv duševního vlastnictví, ke kterým může dojít při používání těchto produktů. Objednávky na všechny produkty jsou přijímány v souladu s pravidly a podmínkami dostupnými na www.exbio.cz. EXBIO, EXBIO Logo a všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti EXBIO Praha, a.s.

Příloha č. 2 **Jednotková cena zboží**

Poř. č.	Název	Obchodní název	Jednotková cena za 1 balení v Kč bez DPH	Sazba DPH v %	Jednotková cena za 1 balení v Kč včetně DPH	Katalogové číslo
1.	Stanovení aktivace basofilů metodou průtokové cytometrie	BasoFlowEx Kit	**14 000,00**	21	**16 940,00**	ED7043
2.	Stanovení fagocytární aktivity neutrofilů metodou průtokové cytometrie	FagoFlowEx Kit	**8 960,00**	21	**10 841,60**	ED7042

[redacted]

Datum: 2022.05.04
11:29:28 +02'00'

.....
Podpis prodávajícího

[redacted]

Datum: 2022.05.04
11:30:46 +02'00'