

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
Zastoupen: Vladimírem Viklickým, předsedou představenstva, Ing.
Stanislavem Lancouchem, místopředsedou představenstva

IČ: 25548611
DIČ: CZ25548611
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 (dále také jen „veřejná zakázka“) v souladu s výzvou/zadávací dokumentací kupujícího ze dne 24. 7. 2023, a to na základě výsledku řízení na veřejnou zakázku na dodávky s názvem „**Stanovení aktivace basofilů a fagocytární aktivity neutrofilů metodou průtokové cytometrie 2023 II.**“, 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, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „ZZVZ“), a nabídkou prodávajícího ze dne 14. 8. 2023

Článek I. Předmět a účel smlouvy

1. Předmětem této smlouvy jsou opakující se dodávky laboratorních diagnostických souprav umožňujících stanovení aktivace basofilů a fagocytární aktivity neutrofilů metodou průtokové cytometrie (dále jen „zboží“) uvedených v Příloze 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 „objedávka“).
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 cenu dle Přílohy č. 2 Jednotková cena zboží.
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 žádosti kupujícího ke zboží předložit bezpečnostní listy a příbalové letáky v českém jazyce, a to buď v tištěné, nebo elektronické podobě.
9. Dodání předmětu plnění zahrnuje úplnou dodávku požadovaného zboží včetně návodu k použití v českém jazyce (v listinné nebo v elektronické podobě), balného, dopravy do místa plnění, roznosu do kupujícím určených prostor v místě plnění, pojištění zboží v rámci dopravy do místa plnění, celních, daňových a případných veškerých dalších poplatků spojených s realizací předmětu této smlouvy. Povinnost prodávajícího předložit kupujícímu návod k použití v českém jazyce (v listinné nebo v elektronické podobě) je splněna, pokud tak učiní v rámci 1. dílčí objednávky každého jednotlivého druhu zboží, nebo pokud již návod k použití v českém jazyce předložil kupujícímu v nabídce v rámci veřejné zakázky, která uzavření této smlouvy předcházela. Nastane-li během trvání této smlouvy na straně výrobce změna v obsahu či rozsahu návodu k použití, je prodávající povinen předložit kupujícímu aktuální (změněný) návod k použití zboží v českém jazyce, a to bez zbytečného odkladu od provedení změny v návodu k použití. Pro doručení návodu k použití v elektronické podobě prodávající použije elektronickou adresu kupujícího uvedenou v čl. XI. odst. 11 této smlouvy.
10. Prodávající je povinen při plnění smlouvy postupovat s nejvyšší možnou odbornou péčí v zájmu kupujícího.

Článek II. Objednávky v rámci smlouvy

1. Objedávka musí obsahovat minimálně označení smluvních stran, určení druhu a množství zboží a místo dodání zboží. Objedávka 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. Objedávka kupujícího vyžaduje písemnou formu. Přijetí (potvrzení) objednávky prodávajícím vyžaduje také 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 (např. z důvodu zpoždění dodávky zboží ze strany výrobce), dohodly se smluvní strany, že prodávající ihned (ve lhůtě do 2 pracovních dnů) písemně o této skutečnosti vyrozumí kupujícího, kterého současně upozorní na možné prodlení s dodáním objednaného zboží podle odst. 1. V takovém případě se prodávající dohodne s kupujícím na době dodání objednaného zboží. Tato dohoda bude stvrzena písemnou akceptací. Nebo prodávající kupujícímu nabídne obdobné plnění, které svým charakterem odpovídá předmětu této smlouvy, 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 místo 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 **48** měsíců ode dne nabytí účinnosti.
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. Proávající se zavazuje předat kupujícímu doklady ke zboží, které se ke zboží vztahují ve smyslu § 2087 občanského zákoníku v českém jazyce (přínejmenším kupujícím potvrzený dodací list, specifikující dodanou položku zboží, její množství a cenu).
4. Součástí balení zboží je příbalová informace v českém jazyce, vyznačená doba použitelnosti, číslo šarže zboží.
5. Doba použitelnosti zboží (exspirace) při jeho převzetí je min. 6 měsíců.
6. Proávající 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.

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

Článek V.

Kupní cena a platební podmínky

1. 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.
2. 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.
3. Ke kupní ceně prodávající účtuje daň z přidané hodnoty podle právních předpisů platných v době uskutečnění zdanitelného plnění.
4. Jednotkové ceny za zboží uvedené v Příloze č. 2 této smlouvy je možné překročit pouze v závislosti se změnou daňových předpisů týkajících se DPH. Jednotkové ceny za zboží lze dále měnit nejvýše o meziroční změnu míry inflace, vyjádřenou procentním přírůstkem průměrného ročního indexu spotřebitelských cen za uplynulý rok, dle údajů zveřejněných Českým statistickým úřadem za předchozí kalendářní rok. Prodávající je oprávněn takový požadavek vznést vždy, nejpozději do 31.3., příslušného kalendářního roku, v němž tato smlouva trvá. Případná cenová úprava je možná pouze od okamžiku písemné akceptace takového požadavku ze strany kupujícího, formou dodatku k této smlouvě a není na ni právní nárok.
5. 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 uvedeného v Příloze č. 2 této smlouvy na srovnatelnou úroveň. Prodávající změny oznámí kupujícímu písemně.
6. Kupující zaplatí kupní cenu na základě faktury, kterou prodávající vystaví po dodání zboží na základě smlouvy. Ke každé objednávce bude vystavena samostatná faktura s uvedením čísla objednávky.
7. 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. V případě elektronického zaslání faktury je prodávající povinen doručit fakturu na adresu elektronické pošty podatelna@zuova.cz.
8. Faktura je splatná ve lhůtě 30 kalendářních dnů ode dne prokazatelného doručení

faktury kupujícímu, není-li na faktuře vyznačena delší lhůta splatnosti.

9. 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.
10. Platba faktury se považuje za uskutečněnou odepsáním příslušné částky z účtu kupujícího.
11. 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 plátcem 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. Proávající 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 prodávající 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.
12. 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. Proávající prohlašuje, že zboží je výhradně jeho vlastnictvím, není předmětem zástavy a ni jiného závazku a že mu není známo, že by zboží bylo zatíženo jakýmkoliv 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 - expirace, nekompletnost dodávky, zjevné vady zboží, atp.), oznámit prodávajícímu bez zbytečného odkladu písemně poté, kdy je zjistil, nejpozději však do uplynutí doby použitelnosti (expirace) 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. To neplatí, pokud se smluvní strany dohodnou na dodání objednaného zboží v jiném dohodnutém termínu podle Čl. II. odst. 3 této smlouvy.
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 a vyhrazené změny závazku

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.
2. Kupující si vyhrazuje v souladu s ustanovením § 100 odst. 1 ZZVZ právo:
 - a) změnit závazek ze smlouvy spočívající ve změně jednotlivých položek veřejné zakázky za současného splnění následujících podmínek:
 - prodávající doloží, že nabídnuté zboží (položka) není dostupné na trhu bez jeho zavinění a nelze jej zajistit ani s vynaložením veškerého úsilí,
 - prodávající doloží a prokáže, že náhradní zboží bude mít stejné nebo lepší užité vlastnosti než zboží původně nabídnuté,

- jednotková cena zboží nebude vyšší než cena v místě a čase obvyklá,
 - nabídnuté zboží (položka) nemění celkovou povahu veřejné zakázky.
- b) změnit závazek ze smlouvy spočívající v rozšíření předmětu plnění veřejné zakázky za současného splnění následujících podmínek:
- kupující zavede nové nebo inovuje vyšetřovací metody související s předmětem veřejné zakázky pro něž budou nezbytná jiná než v zadávací dokumentaci uvedená diagnostika (zboží),
 - jednotková cena zboží nebude vyšší než cena v místě a čase obvyklá,
 - nabídnuté zboží (položka) nemění celkovou povahu veřejné zakázky.
- c) změnit závazek ze smlouvy spočívající v rozšíření předmětu plnění veřejné zakázky o inovované či nové výrobky (zboží) za současného splnění následujících podmínek:
- tyto výrobky (zboží) nebyly v průběhu plnění veřejné zakázky uvedeny na trhu, nebo nebyly registrovány, nebo byly registrovány jiným způsobem než v zadávací dokumentaci,
 - jednotková cena zboží nebude vyšší než cena v místě a čase obvyklá,
 - nabídnuté zboží (položka) nemění celkovou povahu veřejné zakázky.
3. K uplatnění vyhrazených změn závazku uvedených v předchozím odstavci tohoto článku se vyžaduje sepsání písemného dodatku.

Článek XI. Závěrečná ustanovení

1. Vztahy účastníků z této smlouvy se řídí příslušnými ustanoveními zákona č.89/2012 Sb., občanský zákoník ve znění pozdějších předpisů.
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, nevyplyvá-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 delším 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 kterákoliv 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 signature block]

Ve věci objednávky:

[Redacted signature block]

Za prodávajícího je oprávněn jednat:

[Redacted signature block]

Ve věci objednávky:

[Redacted signature block]

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: 2023.09.11
12:28:11 +02'00'

Ing. Eduard Ježo
ředitel Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě

Ve Vestci, dne:

za prodávajícího:

Digitálně podepsal

Datum: 2023.09.11
08:27:16 +02'00'

.....
podpis osoby oprávněné zastupovat

Digitálně podepsal

Datum: 2023.09.11
08:29:39 +02'00'

Příloha č. 1 Specifikace nabízených diagnostických souprav

(doplní dodavatel formou technické specifikace (popisu) a případného vyobrazení nabízených diagnostických souprav)

exbio

FagoFlowEx Kit

100 testů | Kat. č. ED7042



Návod k použití (CS)

Verze: ED7042_IFU_v8_CS

Datum vydání: 14-04-2023

Symbole použité k označení prostředku

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Omezení teploty
	Označení shody CE		Chránit před slunečním zářením
	Výrobce		Chránit před vlhkem
	Jedinečná identifikace prostředku (UDI)		Obsah
	Čtěte návod k použití		Označení shody UKCA
	Obsah postačuje pro <n> testů		
	Katalogové číslo		
	Kód dávky		
	Použít do data		

1. Určený účel prostředku

FagoFlowEx Kit je určen pro stanovení fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů měřením respiračního (oxidačního) vzplanutí z plné krve pomocí průtokové cytometrie.

Co se zjišťuje a/nebo měří

Prostředek detekuje a měří dva parametry pomocí fluorogenního substrátu Dihydrorhodamin 123:

- procento neutrofilních granulocytů, které produkují reaktivní metabolity kyslíku (ROS) v reakci na pohlcení bakterií *E. coli*
- intracelulární aktivitu enzymů zodpovědných za produkci ROS.

Funkce prostředku

Prostředek je určen pro screening/pomoc při stanovení diagnózy vrozené nebo získané imunodeficiency.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Neschopnost neutrofilních granulocytů katalyzovat produkci reaktivních forem kyslíku způsobuje Chronickou granulomatózní chorobu (CGD), skupinu dědičných poruch se společným fenotypovým projevem, závažnými opakujícími se bakteriálními a mykotickými infekcemi s tvorbou granulomů ve tkáních ^(1, 2, 3, 4). Výsledky, které odpovídají CGD mohou mít příčinu také v deficitu MPO, který je nejčastější poruchou fagocytů, obvykle s projevy normálního fenotypu bez častějšího výskytu infekcí ⁽⁵⁾.

Pokles fagocytární aktivity bez poruchy enzymů produkujících ROS provází různé jiné klinické stavy spojené s oslabením imunity, buď primární variabilní imunitní nedostatečnost a deficit plazmatických opsoninů, nebo sekundární imunitní nedostatečnost ^(6, 7).

Typ testu

Není automatizovaný

Kvantitativní

Typ požadovaného vzorku

Vzorek lidské antikoagulované periferní plné krve

Testovací populace

Pacient s podezřením na poruchu funkce granulocytů

2. Účel použití

Prostředek je určen pouze pro profesionální použití v laboratoři. Prostředek není určen pro vyšetření v blízkosti pacienta nebo přímo u pacienta a není určen pro sebetestování.

Požadavky na kvalifikaci

Uživatel musí mít současné odborné znalosti v oblasti průtokové cytometrie, ovládat standardní laboratorní techniky, včetně pipetování, manipulovat bezpečně a správně se vzorky z lidského těla.

Uživatel musí splňovat normu EN ISO 15189, případně jiné národní legislativní normy.

3. Princip testu

Test je založen na měření produkce ROS v neutrofilních granulocytech pomocí fluorogenního substrátu Dihydrorhodaminu 123 (DHR123).

Během testu je vzorek lidské krve smíchán s tepelně inaktivovanými bakteriemi *E. coli* a s DHR123. Pohlcení *E. coli* neutrofilními granulocyty se podpoří zahřátím reakční směsi na 37 °C. Během inkubace jsou bakterie aktivně pohlcovány buňkami a pasivně po svém koncentračním gradientu do intracelulárního prostoru vstupuje nefluorescenční DHR123. Bakterie zůstanou zachycené uvnitř buněčných fagozomů a spustí enzymatické reakce, které vedou k produkci ROS. Ionty ROS oxidují DHR123 na fluorescenční rhodamin 123 (R123), který je excitován laserovým paprskem z průtokového cytometru během akvizice krevního vzorku. Následná emise světla z R123, která je přímo úměrná intracelulární aktivitě enzymů produkujících ROS, je zachycovaná a analyzovaná průtokovým cytometrem.

Paralelně se stimulací *E. coli* se provádějí další dvě reakce, negativní kontrolní reakce, která je reakcí bez *E. coli*, a pozitivní kontrolní reakce, která bez fagocytózy aktivuje enzymy k produkci ROS pomocí forbol 12-myristát 13-acetátu.

Buňky jsou považovány za aktivně fagocytyující, pokud jejich fluorescence převyšuje fluorescenci buněk z reakce negativní kontroly. Výsledek je uváděn v procentech fagocytyujících buněk. Intenzita fluorescence fagocytyujících buněk je přímo úměrná intracelulární aktivitě enzymů produkujících ROS.

4. Poskytované materiály

Obsah

Prostředek FagoFlowEx Kit vystačí na provedení 100 testů a je dodáván ve formátu:

E. coli (5 lahviček) obsahující lyofilizované bakterie *E. coli*, 1 lahvička dostačuje pro stimulaci 20 vzorků krve (ED7042-1).

DHR123 (5 lahviček) obsahující lyofilizovaný Dihydrorhodamin 123, 1 lahvička dostačuje pro obarvení 60 vzorků krve (ED7042-2).

Stimulation Control (5 lahviček) obsahující lyofilizovaný PMA (forbol 12-myristát 13-acetát), 1 lahvička je určena pro 20 pozitivních kontrolních testů (ED7042-3).

Lysing Solution (1 láhev) obsahující 15 ml roztoku připraveného k použití

(ED7042-4).

5. Nutné, ale neposkytované materiály

Testovací zkumavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

6. Nutná zařízení

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (10 – 1000 µl) pro pipetování vzorků a činidel

Vortex

Termostatický inkubátor nebo vodní lázeň umožňující inkubovat testovací zkumavky při 37 °C

Průtokový cytometr vybavený laserovým excitačním zdrojem (488 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů z fluorochromů uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v prostředí

Fluorochrom	Excitace [nm]	Emise [nm]
Rhodamin 123	488	525

POZNÁMKA: Prostředek byl testován na průtokových cytometrech BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), BD FACSLytic™ (BD Biosciences), Navios EX (Beckman Coulter), DxFLEX (Beckman Coulter) a Sysmex™ XF-1600 (Sysmex Corporation).

7. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

Nezamrazujte.

Informace o stabilitě po prvním otevření a době použitelnosti po prvním otevření, spolu s podmínkami skladování a stabilitou pracovních roztoků (v případě potřeby) naleznete v části 10 Postup (Příprava reagentů).

8. Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VÝSTRAHA: Lysing Solution (ED7042-4) obsahuje formaldehyd (č. 50-00-0) a metanol (č. 67-56-1) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Nebezpečí
	
H-věty	H302 Zdraví škodlivý při požití. H315 Dráždí kůži. H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci. H319 Způsobuje vážné podráždění očí. H335 Může způsobit podráždění dýchacích cest. H341 Podezření na genetické poškození. H350 Může vyvolat rakovinu.
P-věty	P201 Před použitím si obstarejte speciální instrukce. P264 Po manipulaci důkladně omyjte ruce a zasažené části těla. P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle. P301+P312 PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte lékaře. P302+P352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. P305+P351+P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. P308+P313 PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P333+P313 Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P362+P364 Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Úplné informace o rizicích, která představují chemické látky a směsi obsažené v tomto výrobku a o tom, jak s nimi zacházet a jak je likvidovat, naleznete v Bezpečnostním listu (SDS), který je k dispozici na www.exbio.cz.

Biologické riziko

Lidské biologické vzorky, krevní vzorky a jakékoliv materiály, které s nimi přicházejí do kontaktu, jsou vždy považovány za infekční.

Používejte osobní ochranné a bezpečnostní pomůcky, abyste zabránili kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.

Dodržujte všechny platné zákony, předpisy a postupy pro manipulaci a likvidaci infekčních materiálů.

Projevy znehodnocení prostředku

Normální vzhled dodaných lyofilizovaných reagensů je bílý prášek (*E. coli* a Stimulační kontrola) nebo bílá pevná hmota (DHR123). Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. změnu barvy nebo skupenství (zkapalnění).

Normální vzhled lyzačního roztoku je čirá kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

9. Vzorek

Použijte žilní periferní krev odebranou do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem heparin.

POZNÁMKA: Antikoagulancia EDTA a citrát negativně ovlivňují výsledky testu.

Vzorek krve v odběrové zkumavce musí být skladován při pokojové teplotě. Neuchovávejte v chladničce.

Vzorek krve zpracujte nejpozději do 24 hodin po odběru.

10. Postup

Příprava reagensů

E. coli

Rekonstituujte obsah lahvičky s *E. coli* ve 250 µl deionizované vody. Připravujte čerstvě každý den měření, skladujte při 2-8 °C a spotřebujte do 8 hodin. Případně lze reagensii zmrazit na -20 °C až -80 °C a použít do 7 dnů.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se opakovaného zmrazování a rozmrazování.

DHR123

Rekonstituujte obsah lahvičky DHR123 v 650 µl deionizované vody. Připravujte čerstvě každý den měření, skladujte při 2-8 °C a spotřebujte do 8 hodin. Případně lze reagensii zmrazit na -20 °C až -80 °C a použít do 7 dnů.

POZNÁMKA: Reagencie vydrží až 5 cyklů zmrazení a rozmrazení.

Stimulation control

Rekonstituujte obsah lahvičky Stimulation control ve 250 µl deionizované vody. Přípravujte čerstvě každý den měření, skladujte při 2-8 °C a spotřebujte do 8 hodin. Případně lze reagentii zmrazit na -20 °C až -80 °C a použít do 7 dnů.

POZNÁMKA: Reagencie vydrží až 5 cyklů zmrazení a rozmrazení.

Lysing Solution

Reagencie je připravena k použití.

POZNÁMKA: Před použitím vytemperujte reagentii na pokojovou teplotu.

Značení vzorku

1. Pro vyšetření jednoho pacienta označte tři zkumavky s kulatým dnem 12 x 75 mm příslušnou identifikací vzorku a označením

**E. coli stimulovaná reakce,
pozitivní kontrolní reakce (stimulace PMA)
a negativní kontrolní reakce.**

Pipetujte na dno zkumavek

- 10 µl E. coli do zkumavky označené jako E. coli stimulovaná reakce.
 - 10 µl Stimulation Control do zkumavky označené jako pozitivní kontrolní reakce.
 - Do zkumavky označené jako negativní kontrolní reakce nepipetujte nic.
2. Pipetujte 50 µl dobře promíchaného krevního vzorku na dno každé ze zkumavek a jemně vortexujte.

UPOZORNĚNÍ: Vyvarujte se pipetování krve na stěnu zkumavky. Pokud stopy nebo kapky krve ulpí na stěně zkumavky, nemusí být obarveny reagentií nebo nemusí dojít k lýzi erytrocytů a výsledek testu nemusí být platný.

3. Přidejte 10 µl DHR123 na dno každé ze zkumavek a jemně vortexujte.
4. Umístěte zkumavky do 37 °C na 20 min do vodní lázně nebo na 30 minut do termostatického inkubátoru.
5. Přidejte 50 µl lyzačního roztoku do každé ze zkumavek. Jemně vortexujte a inkubujte zkumavky po dobu 5 minut při pokojové teplotě ve tmě.
6. Přidejte 1 ml deionizované vody do každé ze zkumavek, jemně vortexujte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě ve tmě.

7. Obarvený vzorek ihned měřte průtokovým cytometrem. V případě, že obarvený vzorek nebude okamžitě změřen, uchovávejte v temnu při 2-8 °C a analyzujte do 2 hodin.

UPOZORNĚNÍ: Fluorescence Rhodaminu 123, vzniklého oxidací DHR123, je detekována v kanálu FITC (525 nm). Rhodamin 123 se z granulocytů rychle uvolňuje, jak je ukázáno na obrázku 8, proto je třeba **změřit vzorky co nejdříve** (nejpozději 2 hodiny od lyze), nejlépe **ve standardizovaném úzkém časovém okně** (viz strana 18).

UPOZORNĚNÍ: Bezprostředně před akvizicí průtokovým cytometrem vzorek vortexujte, aby se zabránilo tvorbě agregátů.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s prostředkem FagoFlowEx Kit musí být rutinně kalibrován pomocí fluorescenčních mikrokuliček podle pokynů výrobce cytometru, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

Při nesprávné údržbě může průtokový cytometr poskytovat falešné výsledky.

V sekci 6 Nutná zařízení jsou uvedeny potřebné specifikace cytometru pro lasery a fluorescenční detektory podle excitačních a emisních charakteristik fluorochromů.

Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.

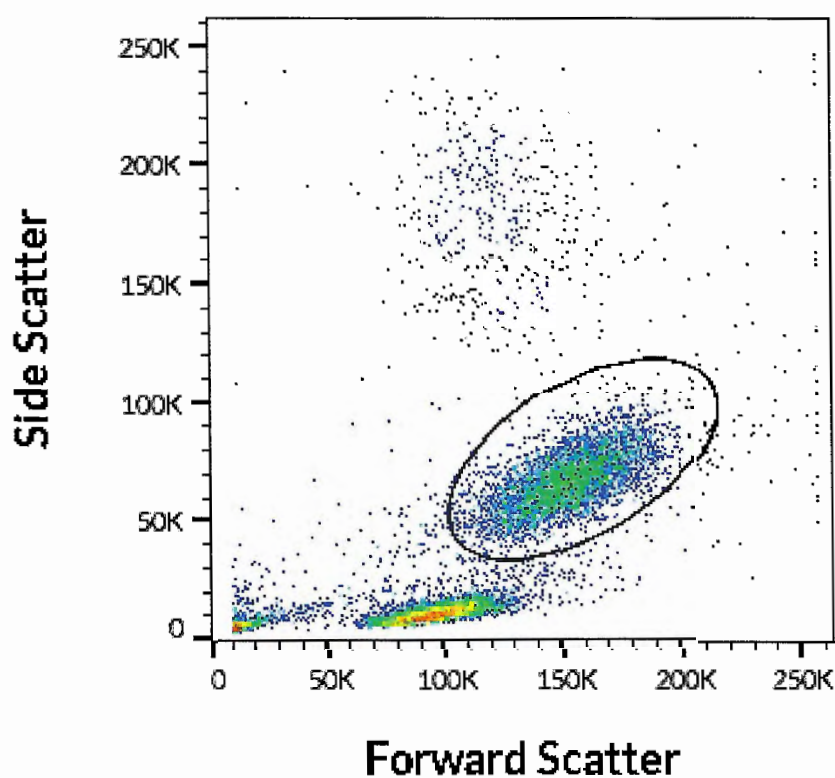
Pro analýzu naměřených dat je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Analýza patientského vzorku

Změřte minimálně 5 000-10 000 leukocytů. Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward scatter (FSC). Ohraničte populaci granulocytů, jak je znázorněno na obrázku 1.

UPOZORNĚNÍ: Pozice granulocytů se v grafu SSC-FSC kvůli pohlcení bakterií mění, proto upravte nastavení ohraničujícího regionu individuálně pro každou reakci.

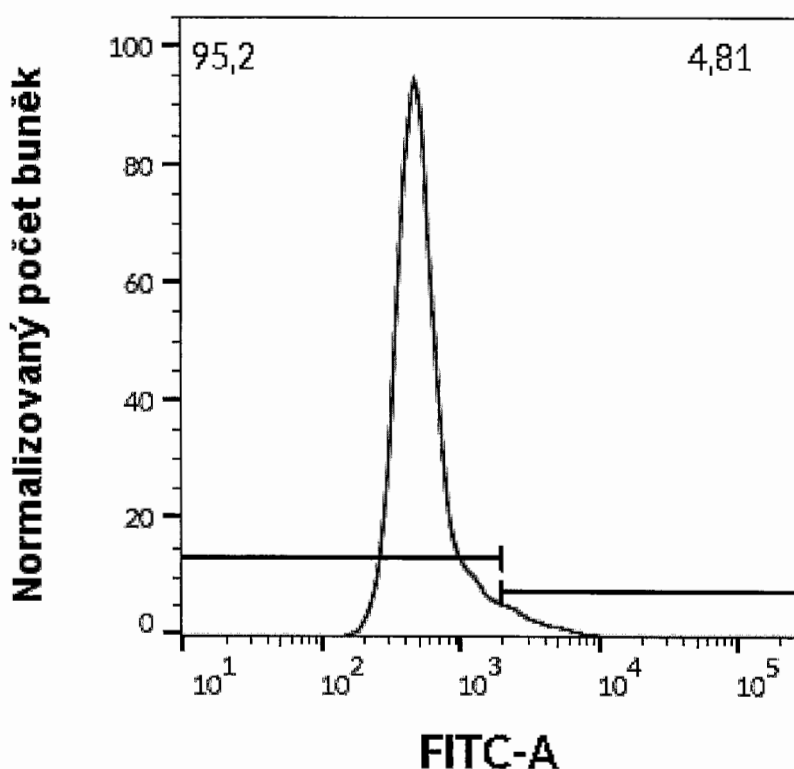
Obrázek 1 Ohraničení populace granulocytů



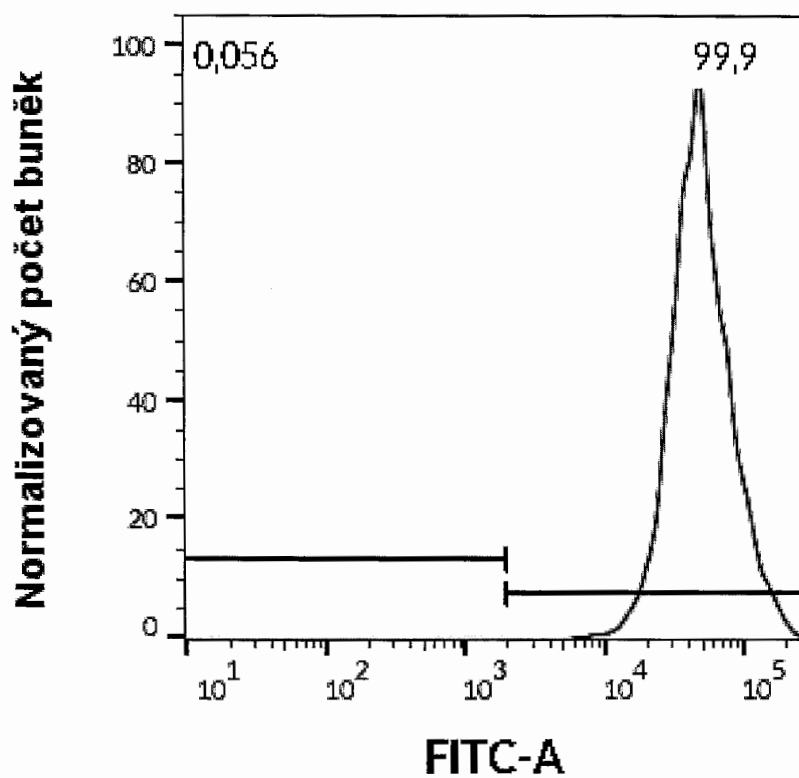
Zobrazte ohraničené granulocyty jako histogram, kde na ose X bude vynesena intenzita fluorescence v kanálu pro FITC. Použijte negativní kontrolní reakci pro nastavení hranice rozdělující pozitivní (aktivně fagocytyující buňky produkující ROS) a negativní (nefagocytyující buňky neprodukující ROS) granulocyty. Zkopírujte rozdělení hranice do histogramů z *E. coli* stimulované reakce a do histogramu z pozitivní kontrolní reakce (obrázek 2a, 2b, 2c).

Granulocyty, u kterých proběhlo oxidační vzplanutí, budou vykazovat jasnou fluorescenci Rhodaminu 123. Vypočítejte střední hodnotu intenzity fluorescence pozitivních a negativních granulocytů. Intenzita fluorescence je přímo úměrná intracelulární aktivitě enzymů produkujících ROS.

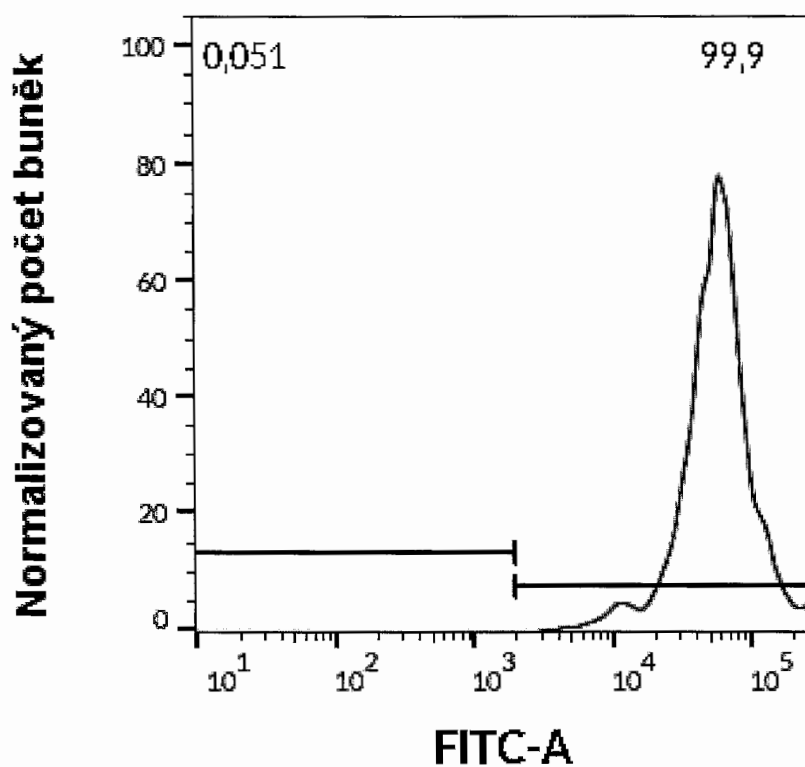
Obrázek 2a Histogram intenzity fluorescence granulocytů z negativní kontrolní reakce



Obrázek 2b Histogram intenzity fluorescence granulocytů z *E. coli* stimulované reakce



Obrázek 2c Histogram intenzity fluorescence granulocytů z pozitivní kontrolní reakce



Výpočet a interpretace analytických výsledků

Kvantitativní parametry

Výsledkem testu jsou dva kvantitativní parametry, které jsou interpretovány s ohledem na to, zda byl detekován defekt ve fagocytární aktivitě nebo defekt v produkci ROS:

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

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

Příklad výpočtu Stimulačního Indexu

Tabulka 2 Negativní kontrolní reakce: MFI negativních a pozitivních granulocytů

Populace	Počet (%)	Průměr FITC-A
negativní	95,2	550
pozitivní	4,81	3995

Tabulka 3 *E. coli* stimulovaná reakce: MFI negativních a pozitivních granulocytů

Populace	Počet (%)	Průměr FITC-A
negativní	0,056	1224
pozitivní	99,9	53836

Střední hodnota intenzity fluorescence pozitivních granulocytů z reakce stimulované *E. coli* (v tabulce 3) podělte střední hodnotou intenzity fluorescence negativních granulocytů z negativní kontrolní reakce (v tabulce 2).

$$\frac{\text{MFI pozitivních granulocytů z reakce stimulované E.coli}}{\text{MFI negativních granulocytů z negativní kontrolní reakce}} =$$

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

Kvalitativní parametry

Kvalitativní interpretace dat zahrnuje přeložení vícero histogramů přes sebe s cílem hodnotit distribuci signálu a identifikovat jednotlivé vrcholy rozdělení, které v případě výskytu vícero granulocytárních populací je nutné analyzovat samostatně.

V případě **defektu respiračního vzplanutí** (nedostatek oxidace DHR123) budou výsledné histogramy granulocytů vykazovat shodu distribuce signálu mezi reakcí stimulovanou *E. coli* a pozitivní kontrolní reakcí (obrázek 4, 5, 6).

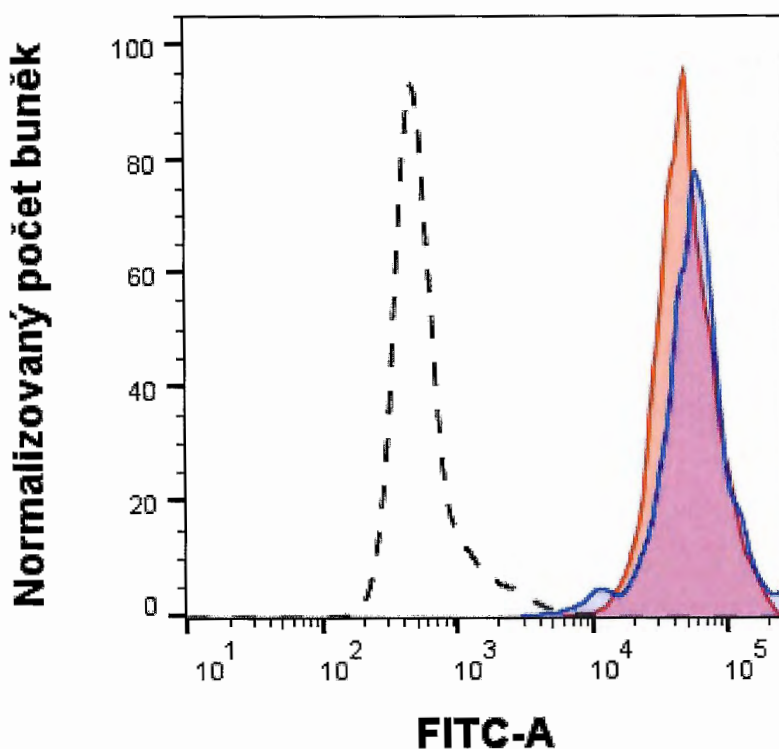
V případě **defektů fagocytární aktivity** (snížené pohlcování částic) budou výsledné histogramy granulocytů ukazovat nesrovnalosti v distribuci signálu mezi reakcí stimulovanou *E. coli* a pozitivní kontrolní reakcí. Reakce stimulovaná *E. coli* bude mít populaci granulocytů rozdělenou do více vrcholů s různou intenzitou fluorescence a pozitivní kontrolní reakce bude ukazovat jednovrcholové rozdělení (obrázek 7).

UPOZORNĚNÍ: Detekce abnormálních výsledků naznačuje pouze podezření na onemocnění, které je třeba potvrdit dalšími testy.

Normální výsledek zdravého dárce

Granulocyty vykazují vysokou úroveň respiračního vzplanutí v reakci stimulované *E. coli* i v pozitivní kontrolní reakci (obrázek 3).

Obrázek 3 Překryv histogramů: Zdravý dárce bez defektu respiračního vzplanutí (SI = 98, relativní počet pozitivních granulocytů 99,9 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované *E. coli* (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).



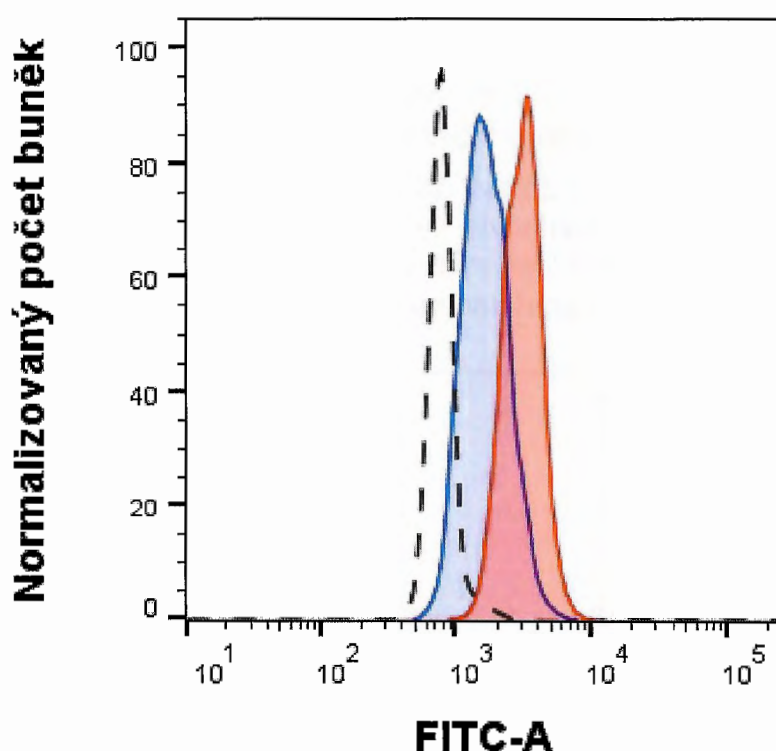
Výsledky ukazující na defekt respiračního vzplanutí

1) Jednovrcholové rozdělení s nízkou intenzitou signálu

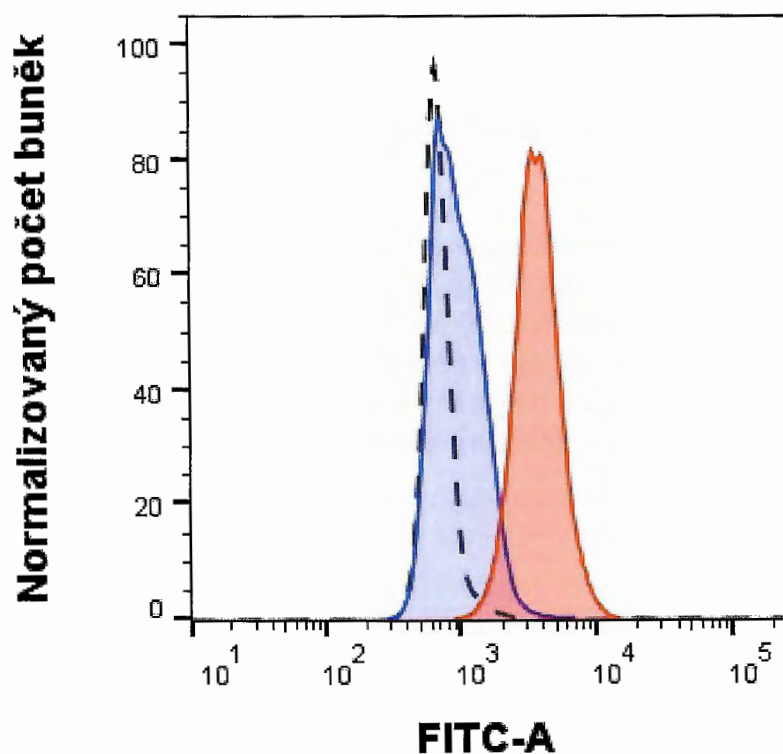
Pokud granulocyty vykazují nízkou úroveň respiračního vzplanutí po *E. coli* stimulaci i v pozitivní kontrolní reakci, ukazuje to buď na **deficit myeloperoxidázy (MPO)** (obrázek 4), nebo méně často na **chronickou granulomatózní chorobu (CGD)** (obrázek 5). Intenzita respiračního vzplanutí u CGD závisí na mutaci enzymového komplexu NADPH oxidázy. Existuje pět autozomálně recesivních typů (1-5) a jeden X-vázaný recesivní typ tohoto onemocnění.

UPOZORNĚNÍ: Test nedokáže rozlišit deficit mezi CGD a MPO.

Obrázek 4 Překryv histogramů: Pacient s deficitem MPO, (SI = 11, relativní počet pozitivních granulocytů 89,7 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované *E. coli* (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).



Obrázek 5 Překryv histogramů: Pacient muž s X-vázanou formou CGD, (SI = 16, relativní počet pozitivních granulocytů 99 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované *E. coli* (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).

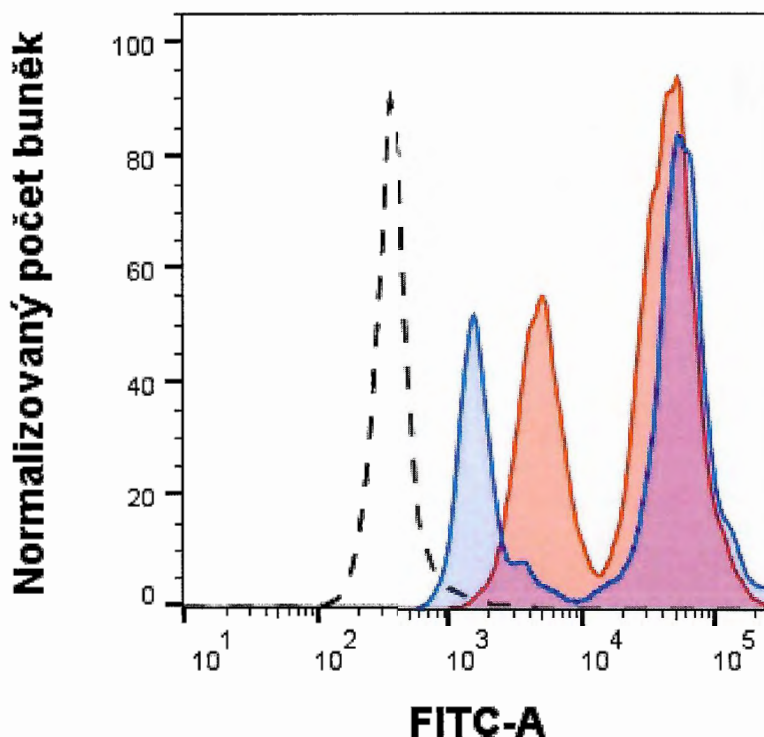


2) Dvouvrcholové rozdělení s různou intenzitou signálu

Pokud v reakci stimulované *E. coli* i v pozitivní kontrolní reakci vykazují granulocyty od pacientky **dvě subpopulace** s odlišnou intenzitou respiračního vzplanutí (obrázek 6), znamená to, že pacientka je přenašečkou X vázané formy CGD.

UPOZORNĚNÍ: Tři a více vrcholů v histogramu poukazují na kontaminaci populace granulocytů při ohraničení v grafu SSC vs. FSC (obrázek 1) jinou subpopulací (monocyty) nebo mrtvými nefagocytujícími buňkami.

Obrázek 6 Překryv histogramů: Žena nesoucí mutaci na chromozomu X v genu NADPH oxidázy. Dvě subpopulace granulocytů se liší intenzitou respiračního vzplanutí (nízký vrchol MFI SI = 14, relativní počet granulocytů 35 %, vysoký vrchol MFI SI = 125, relativní počet granulocytů 65 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované *E. coli* (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).

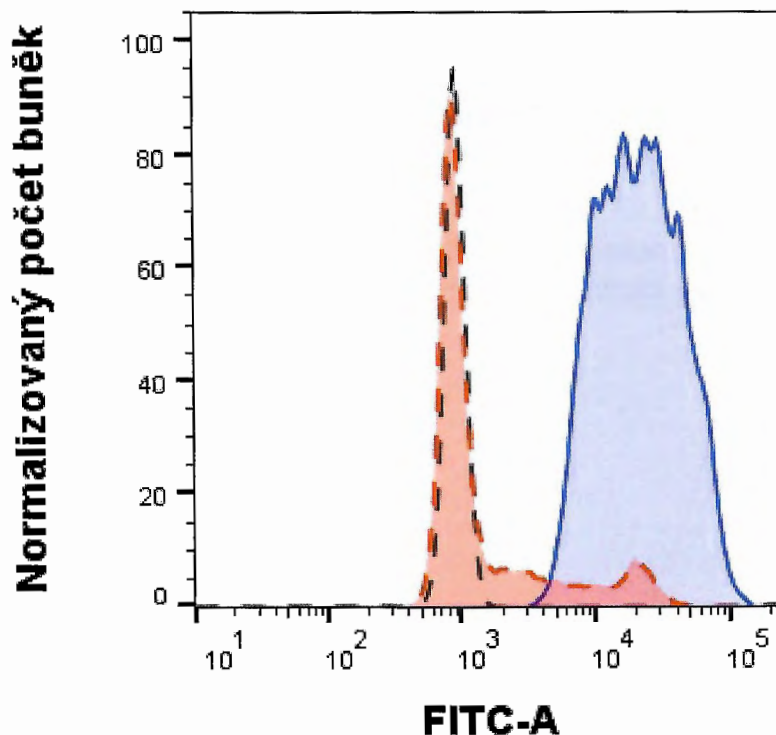


Výsledky ukazující na poruchu fagocytární aktivity

Odlišné distribuční rozdělení mezi reakcí stimulovanou *E. coli* a pozitivní kontrolní reakcí

Pokud granulocyty stimulované *E. coli* vykazují nízkou úroveň respiračního vzplanutí a granulocyty stimulované v pozitivní kontrolní reakci vykazují vysokou úroveň respiračního vzplanutí (obrázek 7), ukazuje to na poruchu fagocytární aktivity granulocytů, případně, že se jedná o vzorek krve, který obsahuje antikoagulant EDTA nebo citrát anebo vzorek starý nebo nesprávně skladovaný.

Obrázek 7 Překryv histogramů: Vzorek antikoagulovaný EDTA, (nízký MFI vrchol SI = 1, relativní počet granulocytů 73 %, vysoký MFI vrchol SI = 25, relativní počet 9 %). Distribuce signálu v detektoru FITC pro granulocyty stimulované *E. coli* (červená výplň), granulocyty z negativní kontrolní reakce (černá přerušovaná čára) a granulocyty z pozitivní kontrolní reakce (modrá výplň).



11. Vlastnosti analytické funkce

Přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost)

Reprodukovatelnost testu byla stanovena z dat získaných pěti operátory analyzujícími šest krevních vzorků zdravých dárců krve ve stejný den za stejných experimentálních podmínek.

Z dat byly vypočteny následující parametry:

a) Pro stanovení relativního počtu pozitivních granulocytů

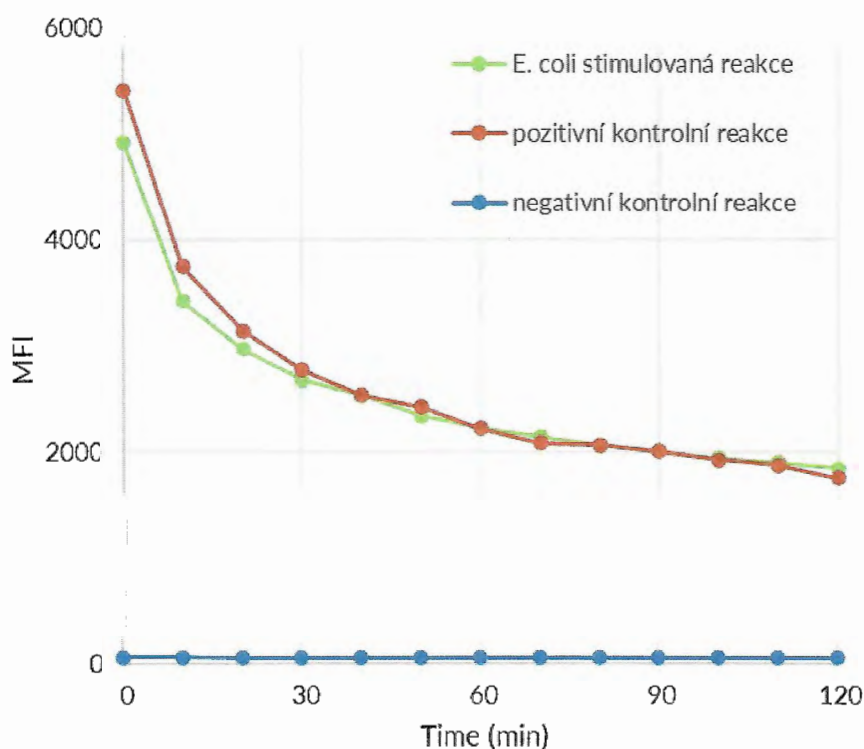
CV = 2 %

b) Pro stanovení stimulačního indexu

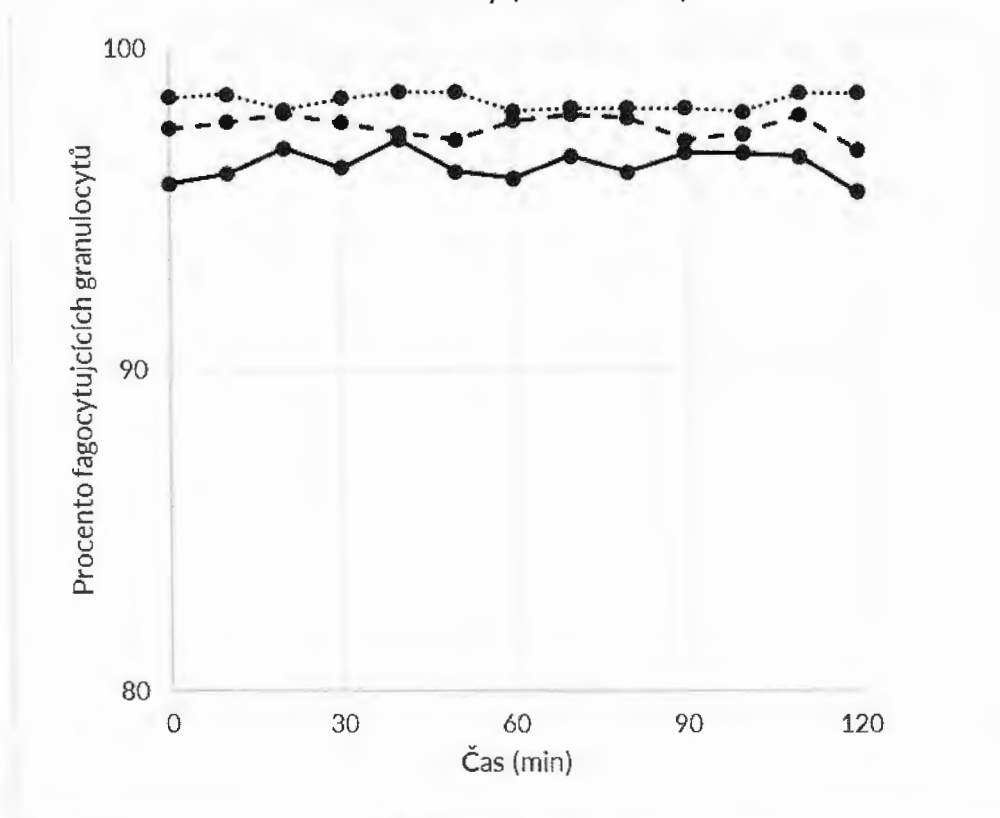
CV = 11 %

Opakovatelnost testu nebyla provedena. Vzhledem k dynamice změn v MFI spojených s uvolňováním R123 z buněk (obrázek 8, 9, 10) by hodnoty opakovatelnosti byly ovlivněny dobou, která uplynula mezi ukončením zpracování vzorku (fixace/lyze červených krvinek) a jeho analýzou pomocí cytometru. Doporučujeme provádět analýzu vzorků v malých sériích a měřit je ve standardizovaném úzkém časovém okně. Případně analyzovat větší série vzorků s časovým odstupem, např. po delší časové prodlevě (40 minut), která minimalizuje variabilitu v MFI.

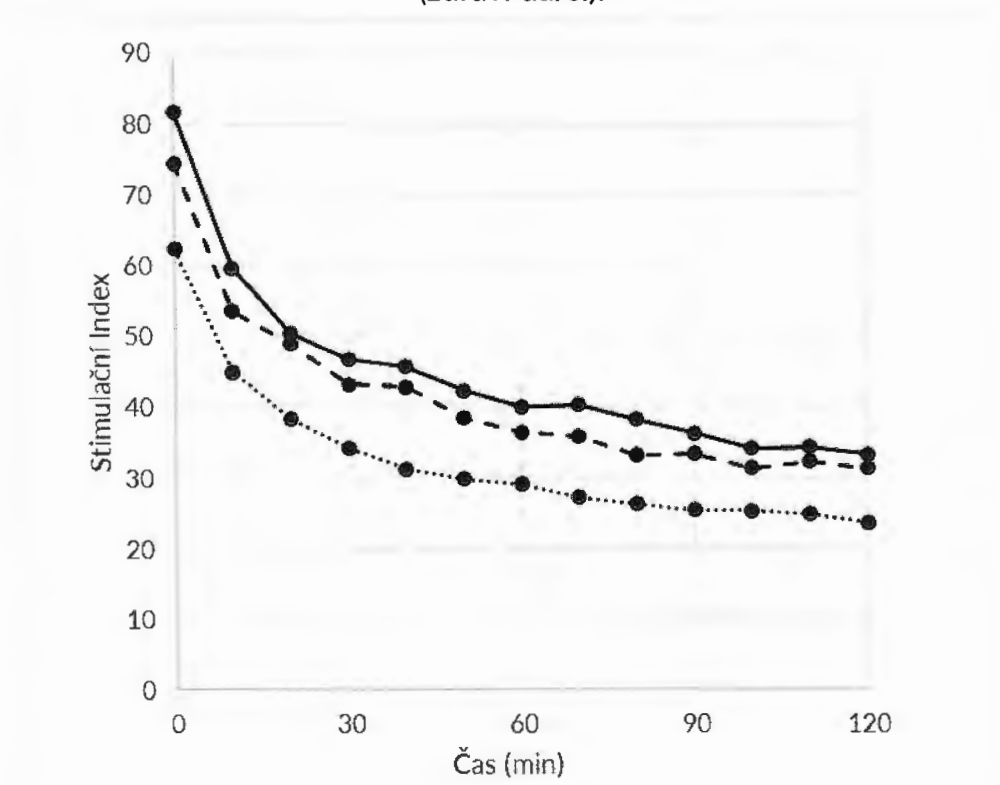
Obrázek 8 Střední hodnota intenzity fluorescence granulocytů v čase po lyzy červených krvinek, ukázán jeden vzorek krve jako příklad (zdravý dárc).



Obrázek 9 Fagocytární aktivita granulocytů (%) v čase po lyzy červených krvinek, 3 různé krevní vzorky (zdraví dárce).



Obrázek 10 Stimulační Index v čase po lyzy červených krvinek, 3 různé krevní vzorky (zdraví dárce).



12. Vlastnosti klinické funkce

Prostředek byl hodnocen srovnávacím měřením s testem PhagoBurst (Orpegen Pharma GmbH) s použitím vzorků od celkem 47 pacientů (tabulka 4). Oba kity byly schopny detekovat: a) selhání ingesce částic (nízká fagocytární aktivita) i b) poruchy oxidativního vzplanutí (deficit MPO, CGD) se 100% citlivostí a 100% specificitou.

Tabulka 4 Charakteristika souboru pacientů ve studii funkční způsobilosti

Popis patientského vzorku	n
Zdravý dárce (nesouvisející imunologická porucha)	40
CGD (2 nemocní a jedna přenašečka)	3
MPO deficit	2
Nízká fagocytární aktivita (model onemocnění - EDTA antikoagulant)	2
Staré vzorky (opakovaná měření zdravých dárců za 48 hodin)	4

13. Očekávané hodnoty

Referenční intervaly pro respirační vzplanutí granulocytů byly stanoveny na 40 vzorcích periferní krve zdravých dárců.

- Počet granulocytů s respiračním vzplanutím

90–100 %

- Stimulační index granulocytů > 30

3. percentil = 31

Medián = 56

97. percentil = 97

Protože se stimulační index může v různých laboratořích a na různých přístrojích lišit, MUSÍ si každá laboratoř ustanovit vlastní rozmezí normálních hodnot pomocí vlastních testovacích podmínek na vzorcích od místní populace zdravých dárců.

14. Rušivé látky a omezení

Antikoagulant EDTA a citrát negativně ovlivňují výsledky testu.

15. Odkazy

- 1) Dinanuer MC. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:89-95. doi: 10.1182/asheducation-2005.1.89. PMID: 16304364.
- 2) de Oliveira-Junior EB, et al. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. Scand J Immunol. 2011 May;73(5):420-7. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02501.x. PMID: 21204900.
- 3) Song E, et al. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. Clin Mol Allergy. 2011 May 31;9(1):10. doi: 10.1186/1476-7961-9-10. PMID: 21624140; PMCID: PMC3128843.
- 4) Kuijpers T, et al. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. Cell Mol Life Sci. 2012 Jan;69(1):7-15. doi: 10.1007/s00018-011-0834-z. Epub 2011 Nov 15. PMID: 22083605; PMCID: PMC3249194.
- 5) Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol. 2005 May;77(5):598-625. doi: 10.1189/jlb.1204697. Epub 2005 Feb 2. PMID: 15689384.
- 6) Rotrosen D, et al. Disorders of phagocyte function. Annu Rev Immunol. 1987;5:127-50. doi: 10.1146/annurev.iy.05.040187.001015. PMID: 3297103.
- 7) Donabedian, H. (1989). Congenital and Acquired Neutrophil Abnormalities. In: Klempner, M.S., Styrut, B., Ho, J. (eds) Phagocytes and Disease. Immunology And Medicine Series, vol 11. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1279-3_6

16. Ochranné známky

BD FACSCanto™ II, BD FACSLytic™, BD Multitest™ a FlowJo™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson and Company, Sysmex™ je registrovaná ochranná známka firmy Sysmex Corporation, VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L..

17. Historie revizí

Verze 8, ED7042_IFU_v8

Uspořádání návodu k použití bylo změněno, texty byly přizpůsobeny požadavkům nařízení (EU) 2017/746.

18. Výrobce

EXBIO Praha, a.s.

Nad Safinou II 341

25250 Vestec

Czech Republic

Kontaktní informace

info@exbio.cz

technical@exbio.cz

orders@exbio.cz

www.exbio.cz

19. Zplnomocněný zástupce

N/A

POZNÁMKA: Jakákoli vážná událost, která se vyskytla v souvislosti s prostředkem, musí být oznámena výrobcí a místnímu příslušnému úřadu.

BasoFlowEx Kit

Kat.č. ED7043

1. Určený účel prostředků

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.

Souvinnost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Klíčovým bodem v diagnostice alergií je co nej přesnější stanovení příčinného alergenu. Běžně užívaná metoda kožních prick testů (SPT) se vyznačuje nízkou spolehlivostí, a kromě toho může u pacientů vyvolat zhoršení alergické onemocnění. Proto je žádoucí využívat testy in vitro, jako je detekce specifických protilátek IgE v séru (sIgE) či analýza aktivních markerů bazofilů. Specifická 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 specifita detekce sIgE podstatně nižší. Oproti tomu se test aktivity bazofilů (BAT) vyznačuje nejen velmi vysokou specifičností, ale i vysokou senzitivitou, a to i v případech řady problematických antigenů.

2. Princip testu

Principem testu je vyvolání aktivity bazofilů in vitro v přítomnosti senzibilizujícího alergenu a následné měření expozice aktivního 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 vysokoafinity receptoru FcγRI, přidání alergen způsobí přemístění receptorů, které vede k plné aktivaci bazofilů spojené s procesem vylitu 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 určena pro stimulaci 20 zkumavek.
- ED7043-2 Stimulation Control – 2 kusy vialek obsahujících lyofilizovaný stimulant pozitivní kontroly, jedna vialka je určena pro stimulaci 25 pozitivních kontrolních vzorků.
- ED7043-3 Staining Reagent – 1 vialka obsahující 2 ml kotektlju 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 x 75 mm)
- Fosfátový pufr (PBS)
- Ultračistá demineralizovaná voda

5. Nutná zařízení

- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Termostát 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 reagentech i na krabici soupravy. Informace o skladování rekonstituovaných reagentů 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 reagenty po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Vzorky 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.
- Reagentie 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: Nečistě-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 nasazené, 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 plicního objemu krve. Antikoagulanty EDTA a citrát ruší analýzu. Vzorky krve skladujte při laboratorní teplotě. Vzorky krve zpracujte nejděle 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 reagentů

- Lyofilizovaný stimulační pufr (Stimulation Buffer) před použitím rekonstituujte pomocí 2 ml demineralizované vody. Nespotebované množství stimulačního pufru je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejděle 5 dní, případně zamrazit při ≤ -20 °C po vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.
- Lyofilizovaný stimulant pozitivní kontroly (Stimulation Control) před použitím rekonstituujte pomocí 0,25 ml demineralizované vody. Nespotebované množství stimulantu je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejděle 30 dní, případně zamrazit při ≤ -20 °C po vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.
- Ostatní reagentie (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:

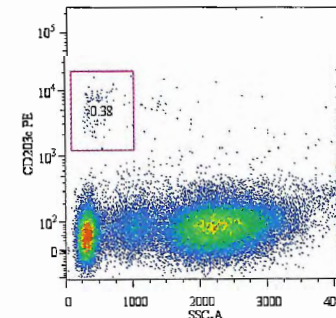
1. Do zkumavek určených pro:

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

Analýza v průtokovém cytometru

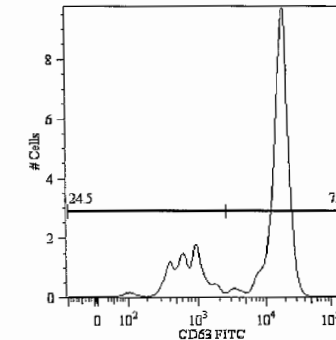
Obarvené vzorky analyzujte průtokovým cytometrem. Jelikož by mělo být analyzováno minimálně 200 bazofilů, změřte cytometrem 50 000-10 0000 událostí od každého vzorku. Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat (FITC a PE kanál). Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus 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}).

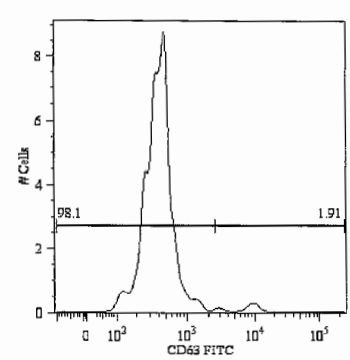


Poté zobrazte ohraničené bazofily v histogramu, kde na ose X je vynesena intenzita fluorescence ve FITC kanálu (FL1), jak je znázorněno na obrázcích 2a,b,c. Pomocí negativní kontroly nastavte region odpovídající CD63^{dim} populaci, která představuje neaktivované bazofily. Poté spočítejte procentuální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

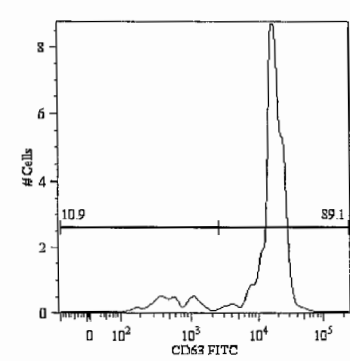
Obr. 2a Histogram populace bazofilů po stimulaci alergenem.



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 pozitivitu testu pro jednotlivé skupiny alergenů, kterou by si měla ustanovit každá laboratoř. Hraniční hodnota pozitivitu testu bývá obvykle nastavena následovně:

inhalační a potravinové alergeny	≥15 %
jed. blankřídlého 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 senzitivizujícími alergeny nezávisle pěti operátory na jednom vzorku krve za stejných experimentálních podmínek. Metodou analýzy rozptýlů byly stanoveny následující parametry opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření:

CV _{opakovatelnost}	= 2,4 %
CV _{reprodukovatelnost}	= 3,4 %

11. Vlastnosti klinické funkce

Specifita a Citlivost

Specifita 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
Specifita (%)	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 určena 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 plnicího objemu krve“.

Do oddílu Skladování a manipulace byl přidán text „Informace o skladování rekonstituovaných reagentů 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



Návod k použití

Verze ED7043_IFU_v6_CS

Datum vydání: 20-01-2020

Symboly

	Katalogové číslo
	Kód dávky
	Použit do data
	Omezení teploty
	Chránit před slunečním zářením
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	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 položky	Jednotka	Obchodní název	Cena za 1 jednotku v Kč bez DPH	Sazba DPH v %	Cena za 1 jednotku v Kč včetně DPH	Jednotková cena za 1 balení v Kč bez DPH	Sazba DPH v %	Jednotková cena za 1 balení v Kč včetně DPH	Počet jednotek v 1 balení	Katalogové číslo
1.	Stanovení aktivace basofilů metodou průtokové cytometrie	balení	BasoFlowEx Kit	14 000,00	21	16 940,00	14 000,00	21	16 940,00	1	ED7043
2.	Stanovení fagocytární aktivity neutrofilů metodou průtokové cytometrie	balení	FagoFlowEx Kit	10 500,00	21	12 705,00	10 500,00	21	12 705,00	1	ED7042

Digitálně

podepsal

Datum: 2023.09.11

08:28:03 +02'00'

Digitálně podepsal

Datum: 2023.09.11

08:29:11 +02'00'

