

IngoFlowEx Kit

Cat.No. ED7040

Descripción del producto

El IngoFlowEx Kit está destinado para la investigación de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos humanos midiendo la ingestión de bacterias *E. coli* identificadas con fluorescencia en la sangre humana completamente heparinizada mediante la citometría de flujo. La fagocitosis, esto significa la absorción de partículas extracelulares por las células es uno de los mecanismos de defensa naturales del sistema inmunológico. La capacidad de la fagocitosis es un rasgo característico de las llamadas células fagocíticas profesionales (granulocitos, monocitos y macrófagos neutrófilos y eosinófilos). El proceso incluye el enlace de la partícula en la superficie celular, la absorción por la célula y la posterior degradación de la partícula. Algunas proteínas plasmáticas (C3b y anticuerpos) ayudan a los fagocitos de tal forma, que enlazándose en la superficie de la partícula crea fácilmente reconocibles ligandos.

El examen se basa en medir la intensidad de la fluorescencia de las células que han absorbido bacterias *E. coli* identificadas con fluorescencia. Una muestra de sangre heparinizada se mezcla con bacterias fluorescentes y se incuba a 37 °C. Paralelamente, se realiza una reacción de control sin *E. coli* para cada reacción con *E. coli*. Este control negativo sirve durante el análisis para establecer el límite entre células fagocíticas y no fagocíticas. Las bacterias libres se eliminan mediante lavados repetidos de la suspensión celular. La fluorescencia de las bacterias enlazadas en la superficie celular se suprime mediante la adición de azul tripan, un colorante vital que no penetra a través de la membrana celular. A continuación, las muestras se exponen a un agente que fija los leucocitos y lisa los eritrocitos. Finalmente, el ADN celular se determina con un reactivo fluorescente, el yoduro de propidio. La designación del ADN ayuda a distinguir los desechos y las conglomeraciones de bacterias de los leucocitos.

Las bacterias utilizadas en la prueba se oponizaron con plasma AB humana, por lo que los resultados no dependen principalmente de la capacidad de opsonización del plasma de la muestra examinada.

Especificaciones

E. coli FITC (preparado para su uso) contiene una suspensión de la cepa K-12 de *E. coli* identificada con fluorescencia opsonizada con plasma humano.

Quenching Solution (preparado para su uso) contiene una solución tamponada de azul de tripan.

Lysing Solution (solución concentrada 10x) contiene un concentrado de agente de lisado-fijador.

Wash Buffer (solución concentrada 25x) contiene amortiguador de lavado concentrado.

DNA Staining Solution (preparado para su uso) contiene una solución amortiguadora de yoduro de propidio.

Materiales proporcionados

ED7040-1 *E. coli* FITC, 1 x 1 ml, es suficiente para realizar 100 reacciones.

ED7040-2 Quenching Solution, 1 x 20 ml, es suficiente para realizar 200 reacciones.

ED7040-3 Lysing Solution, 1x60 es suficiente para preparar 600 ml 1x Lysing Solution = 300 reacciones.

ED7040-4 Wash Buffer, 1 x 80 ml, es suficiente para la preparación de 2 litros 1x Wash buffer = 222 reacciones.

ED7040-5 DNA Staining Solution, 1 x 60 ml, es suficiente para la preparación de 200 reacciones.

Materiales necesarios pero no proporcionados

Agua desionizada (dH₂O), aproximadamente 0,6 litro

Solución salina tamponada con fosfato (PBS), aproximadamente 2 litros

Tubo de ensayo de 5 ml (12 x 75 mm)

Almacenamiento y manipulación

Almacene el IngoFlowEx Kit a 2-8 °C. La fecha de caducidad se indica en las etiquetas de los reactivos y en el paquete exterior del conjunto.

Advertencias y precauciones preventivas

- Destinado únicamente a fines de investigación.
- No utilice los reactivos después de su fecha de vencimiento.
- Proteja el contenido de los viales de la contaminación.
- Las bacterias se suministran en una suspensión lista para usar, la intensidad de fluorescencia media de las bacterias puede cambiar durante el almacenamiento, sin embargo, los resultados de las pruebas para evaluar el porcentaje de células fagocíticas permanecen sin cambios.

- Las muestras de sangre se consideran como un material potencialmente infeccioso y deben manipularse adecuadamente. Trabaje exclusivamente con guantes protectores y siga los procedimientos para manipular material potencialmente infeccioso. Evite el contacto de las muestras con la piel, los ojos y las membranas mucosas.

- Lysing Solution** (ED7040-3) contiene formaldehído, metanol y dietilenglicol. Frases con H H302+312+332: Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H315: Irrita la piel. H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H319: Provoca irritación grave en los ojos. H335: Puede causar irritación en vías respiratorias. H351: Se sospecha que provoca cáncer. H371: Puede causar daño a los órganos. H373: Puede causar daño a los riñones por exposición prolongada o repetida. Frases con P P270: No coma, no beba ni fume mientras utilice este producto. P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara. P301+312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llame a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si no se siente bien. P302+352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabón. P305+351+338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuáguelos cuidadosamente con agua durante varios minutos. Qüítelos las lentes de contacto, si los lleva y si son fácil de quitar. Continúe enjuagándolos. P501: Líquide el contenido / el embalaje en un lugar autorizado de recogida de residuos peligrosos.

- Quenching Solution** (ED7040-2) contiene una solución de azul tripan al 0,08 %. Frases con H H350: Puede causar cáncer. Frases con P P201: Procure instrucciones especiales antes de su utilización. P270: No coma, no beba ni fume mientras utilice este producto. P280: Use guantes de protección / ropa protectora / protección para los ojos / protección para la cara. P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llame a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si no se siente bien.

- Lysing Solution** (solución concentrada 10x) contiene un concentrado de agente de lisado-fijador. Frases con H H302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabón. P308+P313: EN CASO DE exposición expuesta o sospecha de ella: Obtenga atención médica / tratamiento. P501: Líquide el contenido / el embalaje en un lugar autorizado de recogida de residuos peligrosos.

- La información completa sobre el peligro potencial y la forma segura del trabajo con el producto las obtendrá en el listado de seguridad del mismo.

- La sangre debe introducirse en un tubo con heparina.** Los anticoagulantes EDTA y el citrato cancelan esta determinación.

- Procese las muestras de sangre dentro de las 8 horas posteriores a la recolección.
- La reproducibilidad de la medición depende del cumplimiento de los tiempos de incubación, la temperatura de incubación y la precisión del pipeteo.
- Calibre el citómetro de flujo a diario con bolitas fluorescentes para garantizar una sensibilidad estable del detector.
- El citómetro de flujo puede dar valores incorrectos si no se calibra y mantiene con regularidad.

- El citómetro de flujo puede dar valores incorrectos si no se calibra y mantiene con regularidad.

- La información completa sobre el peligro potencial y la forma segura del trabajo con el producto las obtendrá en el listado de seguridad del mismo.

- La sangre debe introducirse en un tubo con heparina.** Los anticoagulantes EDTA y el citrato cancelan esta determinación.

- Procese las muestras de sangre dentro de las 8 horas posteriores a la recolección.

- La reproducibilidad de la medición depende del cumplimiento de los tiempos de incubación, la temperatura de incubación y la precisión del pipeteo.

- Calibre el citómetro de flujo a diario con bolitas fluorescentes para garantizar una sensibilidad estable del detector.

- El citómetro de flujo puede dar valores incorrectos si no se calibra y mantiene con regularidad.

Utilización prevista

Medición de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos humanos mediante citometría de flujo.

Preparación de los reactivos

Wash Buffer

Diluya el tampón de lavado con PBS antes de usarlo. Puede utilizar la tabla mostrada a continuación para asegurar una dilución adecuada.

Cantidad de muestras de sangre	En total (ml)	Wash Buffer (ml)	PBS (ml)
10	200	8	192
100	2000	80	1920

Señale la fecha del preparado y almacénelo a 2-8 °C durante un tiempo máximo de 4 semanas.

Lysing Solution

Diluya la solución de Lysing Solution con agua desionizada antes de utilizarla. Como ayuda, para

una dilución correcta, puede utilizar la tabla mostrada a continuación.

Cantidad de muestras de sangre	En total (ml)	Lysing Solution (ml)	dH ₂ O (ml)
10	40	4	36
100	400	40	360

Señale la fecha del preparado y almacénelo a 2-25 °C durante un tiempo máximo de 4 semanas.

E. coli FITC

Agite en el vórtice el contenido del vial y meticulosamente antes de usarlo.

Utensilios y dispositivos necesarios

Recipientes y probetas para diluir reactivos
Vórtice
Baño de hielo (cubitos de hielo o hielo picado)
Gradillas de incubación para tubos de ensayo
Juego de pipetas automáticas con puntas desechables
Incubadora o baño de agua (37 °C)
Centrífuga con rotor para tubos de ensayo de 5 ml
Citómetro de flujo - excitación con láser azul 488 nm, detectores de emisión de radiación 525 nm (FITC) y 617 nm (PE).

Procedimiento

Deje enfriar el Wash buffer diluido (2-8 °C).

Deje que la Lysing solution diluida alcance la temperatura ambiente.

Coloque el *E. coli* FITC, Quenching Solution y DNA Staining Solution en hielo.

Prepare un recipiente con hielo y coloque una gradilla para tubos de ensayo en él.

Prepare dos tubos de ensayo para cada muestra de sangre:

- reacción con *E. coli*
- reacción de control (sin *E. coli*)

- Pipeteo 50 µl de sangre en los tubos de ensayo.
- Deje que los tubos de ensayo se enfríen durante 10 minutos en un baño de hielo.
- Añada 10 µl de *E. coli*-FITC al tubo de ensayo destinado para la reacción de *E. coli* y agite el contenido en el vórtice.
- No agregue nada a los tubos de ensayo de control.
- Transfiera todos los tubos de ensayo (incluidos los de control) a una incubadora a 37 °C (o a un baño de agua a 37 °C).
- Deje incubar durante 30 minutos (o 10 minutos en un baño de agua).
- Devuelva los tubos de ensayo al hielo y déjelos enfriar durante 5 minutos.
- Agregue 100 µl de Quenching Solution de enfriamiento a (2-8 °C) y mezcle el contenido. Almacene siempre los tubos de ensayo en hielo.
- Añada 3 ml de Wash Buffer diluido frío a (2-8 °C) y centrifugue los tubos de ensayo con 200 g durante un tiempo de 5 minutos.
- Succione el sobrenadante a un recipiente con desinfectante.
- Repita el lavado (pasos 9 y 10).
- Agite en el vórtice el sedimento con el volumen restante del tam-pón de lavado.
- Añada 2 ml de Lysing Solution diluida (temperatura del laboratorio), mezcle e incube durante 20 minutos a la temperatura del laboratorio protegido de la luz.
- Centrifugue las células en 200 g durante 5 min.
- Succione el sobrenadante.
- Añada 3 ml de Wash Buffer diluido (enfriado) y centrifugue las células en 200 g durante 5 min.
- Aspire el sobrenadante y resuspenda el sedimento en 300 µl de Staining Solution ADN enfriada (2-8 °C).
- Deje incubarlo durante 10 minutos en hielo protegido de la luz.
- Mida las muestras en un citómetro de flujo dentro de las 2 horas posteriores a la adición de Staining Solution ADN.

Medición en un citómetro de flujo

Ajuste del citómetro antes de la primera medición
Realice una serie de reacciones monocromáticas con la muestra de sangre para ajustar la compensación de la transiluminación espectral. Para reacciones monocromáticas, use solo un componente fluorescente del kit en el procedimiento descrito.

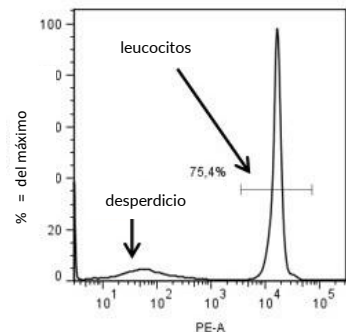
- Muestra de sangre con *E. coli*-FITC (omitir la Quenching Solution y la Staining Solution ADN)
- Muestra de sangre con Quenching Solution (omitir el *E. coli*-FITC y la Staining Solution ADN)
- Muestra de sangre con la Staining Solution ADN (omitir el *E. coli*-FITC y la Quenching solution).

Utilice las reacciones realizadas para ajustar el citómetro.

Análisis de las muestras

Ajuste el intervalo apropiado en el detector de PE (Imagen 1) y permita que se registre un número suficiente de eventos celulares fuertemente fluorescentes (al menos 10,000). Este límite filtra los debris y las conglomeraciones bacterianas en análisis posteriores.

Imagen 1 Delimitaciones de las células que eliminan los debris y las conglomeraciones de bacterias en análisis posteriores.



Visualización de los eventos que caen dentro del intervalo en un gráfico de dispersión lateral (SSC) versus dispersión hacia adelante (FSC) establezca un límite para las subagrupaciones de granulocitos y monocitos (Imagen 2).

Luego, muestre las subagrupaciones delimitadas en histogramas de fluorescencia para FITC (Imagen 3a y 3b). Utilice el histograma de la reacción de control para localizar el límite de discriminación. Por lo general, una configuración común del límite discriminatorio es suficiente para la evaluación de todas las muestras examinadas actualmente.

Imagen 2 Delimitación de subagrupaciones de granulocitos y monocitos.

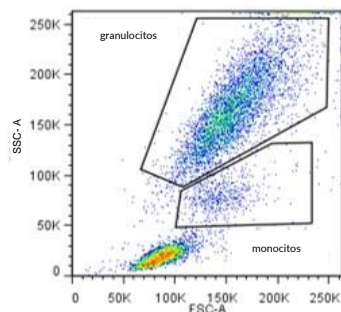


Imagen 3a Histogramas de granulocitos de la reacción con *E. coli* y de la reacción de control plegados entre sí.

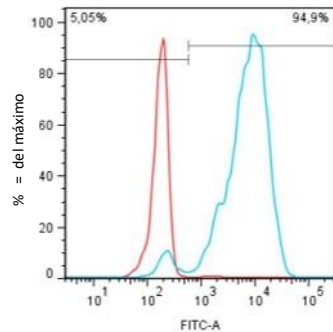
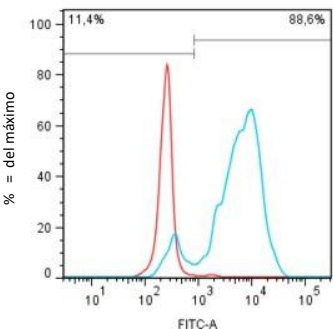


Imagen 3b Histogramas de monocitos de la reacción con *E. coli* y de la reacción de control plegados entre sí.



Los resultados pueden ser interpretados según
1) porcentaje de fagocitos que contienen *E. coli* fluorescente o

2) valores medios de fluorescencia de las células fagocíticas.

El porcentaje de fagocitos activos se denomina **actividad fagocítica**. La tabla muestra los valores medios del porcentaje de células fagocíticas activas, que se calcularon a partir de los datos obtenidos mediante el análisis de muestras de sangre de donantes sanos.

Subagrupaciones de células	% de células activas (promedio+/- 2SD)
Granulocitos	91 (83-100)
Monocitos	82 (72-94)

Repetibilidad

La repetibilidad para determinar el porcentaje de células fagocíticas activas se calculó a partir de los resultados obtenidos midiendo cuatro reacciones paralelas de muestras de sangre de donantes sanos. La variabilidad se expresa mediante el coeficiente de variabilidad promedio.

	% de células activas (magnitud)	CV promedio (%)
Granulocitos	83-97	1,8
Monocitos	73-91	4,8

Enlaces

M. O'Gorman. Clinical evaluation of Myeloid and Monocytic Cell functions in Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology edited by B. Detrick, 7th edition, AMS Press 2006, Page 272-280

Fabricante

EXBIO Praha, s.a.
Nad Safinou II 341
252 50 Vestec
Czech Republic

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

Marcas registradas

N/A

Historia de las revisiones

- Versión 1, ED7040_TDS_v1

Primera edición

- Versión 2, ED7040_TDS_v2

Cambio de diluyente para el tampón de lavado, en lugar de diluir el tampón de lavado con agua desionizada (dH₂O), se recomienda diluir el tampón de lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Se eliminó el texto "La mezcla está clasificada como peligrosa según los criterios de la(s) directiva(s) 67/548/EEC y/o 1999/45/EC" de Precauciones.

- Versión 3, ED7040_TDS_v3

Las frases R y S y el símbolo de peligro se cambiaron por frases H y P y símbolos GHS de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008.

- Versión 4, ED7040_TDS_v4

Correcciones de formato.

- Versión 5, ED7040_TDS_v5

El logo de la empresa cambió. El diseño de IFU cambió. Se agregaron a Símbolos los símbolos "Consultar instrucciones de uso", "Mantener alejado de la luz solar" y "Para uso exclusivo en investigación". El código postal del fabricante cambió de 25242 a 25250.


- Versión 6, ED7040_TDS_v6


Se perfeccionó el texto de Limitación de uso del producto.


Símbolos

REF Número del catálogo

LOT Código de lote

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura

 Consultar las instrucciones de uso

 Mantener apartado de la luz del sol

 Fabricante

RUO Solo para fines de investigación.
No lo utilice para procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.

exbio

IngoFlowEx Kit

100 pruebas | Cat.No. ED7040

Solo para fines de investigación.

No lo utilice para procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.

Listado técnico

Versión ED7040_TDS_v6_ES

Fecha de emitido: 20-04-2020

ES

El producto está destinado únicamente a fines de investigación. Se prohíben las aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

Los productos no se pueden utilizar para la reventa o transferencia a terceros, ya sea como un producto separado o como parte de la producción de otro producto sin el consentimiento por escrito de EXBIO Praha, a.s.

EXBIO Praha, a.s. no será responsable por la infracción de patentes o cualquier otra infracción de los derechos de propiedad intelectual que puedan surgir del uso de estos productos. Los pedidos de todos los productos se aceptan de acuerdo con las reglas y condiciones disponibles en www.exbio.cz. EXBIO, el logotipo de EXBIO y todas las demás marcas comerciales son propiedad de EXBIO Praha, a.s.