

# IngoFlowEx Kit

Kat. č. ED7040

## Popis produktu

IngoFlowEx Kit je určený pro vyšetření fagocytární aktivity granulocytů a monocytů měřením ingesce fluorescenčně značených bakterií *E. coli* v plně heparinované lidské krvi pomocí průtokové cytometrie.

Fagocytóza, tzn. pohlcení extracelulárně se vyskytujících částic buňkami, náleží k přirozeným obranným mechanismům imunitního systému. Schopnost fagocytózy je charakteristická pro profesionální fagocytující buňky (neutrofilní a eosinofilní granulocyty, monocyty a makrofágy). Proces zahrnuje navázání částice na povrch buněk, pohlcení buňkou a následnou degradaci částice. Některé plazmatické proteiny (C3b a protilátky) napomáhají fagocytům v rozpoznávání částic tím, že navázáním na povrch částic vytvoří snadno rozpoznatelné ligandy.

Test je založen na měření intenzity fluorescence buněk, které pohltily fluorescenčně značené bakterie *E. coli*. Vzorek heparinované krve se smíchá s fluorescenčními bakteriemi a nechá se inkubovat při 37 °C. Paralelně se provádí pro každou reakci s *E. coli* také kontrolní reakce bez *E. coli*. Tato negativní kontrola slouží při analýze k nastavení hranice mezi fagocytujícími a nefagocytujícími buňkami. Volné bakterie jsou odstraněny opakovaným promytím suspenze buněk. Fluorescence bakterií navázaných na povrchu buněk je potlačena přidáním trypanové modři, vitamínového barviva, které neprotriká skrz buněčnou membránu. Vzorky jsou poté vystaveny činidlu, které zafixuje leukocyty a lyzuje erythrocyty. Nakonec je buněčná DNA označena fluorescenčním činidlem, propidium jodidem. Označená DNA napomáhá odlišení debrisu a shluků bakterií od leukocytů. Bakterie použité v testu byly opsonizované lidskou AB plazmou, proto výsledky nejsou primárně závislé na opsonizační kapacitě plazmy z vyšetřovaného vzorku.

## Specifikace

**E. coli FITC** (připravené k použití) obsahuje suspenzi fluorescenčně značených bakterií *E. coli* kmene K-12 opsonizovaných lidskou plazmou.  
**Quenching Solution** (připravené k použití) obsahuje pufovaný roztok trypanové modři.  
**Lysing Solution** (10x koncentrovaný roztok) obsahuje koncentrát fixačního-lyzačního činidla.  
**Wash Buffer** (25x koncentrovaný roztok) obsahuje koncentrát promývacího pufru.  
**DNA Staining Solution** (připravené k použití) obsahuje pufovaný roztok propidium jodidu.

## Poskytované materiály

ED7040-1 *E. coli* FITC, 1 x 1 ml, dostačuje pro provedení 100 reakcí.  
ED7040-2 Quenching Solution, 1 x 20 ml, dostačuje pro provedení 200 reakcí.  
ED7040-3 Lysing Solution, 1 x 60 ml, dostačuje pro přípravu 600 ml 1x Lysing Solution = 300 reakcí.  
ED7040-4 Wash Buffer, 1 x 80 ml, dostačuje pro přípravu 2 litrů 1x Wash Buffer = 222 reakcí.  
ED7040-5 DNA Staining Solution, 1 x 60 ml, dostačuje pro provedení 200 reakcí.

## Nutné, ale neposkytované materiály

Deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O), přibližně 0,6 litru  
Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS), přibližně 2 litry  
5ml zkumavky (12 x 75 mm)

## Skladování a manipulace

IngoFlowEx Kit skladujte při teplotě 2-8 °C. Doba použitelnosti je vyznačena na etiketách reagentů a na vnějším obalu soupravy.

## Výstrahy a předběžná opatření

- Určeno pouze pro výzkumné účely.
- Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby jejich použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Bakterie jsou dodávány v suspenzi připravené k použití, průměrná intenzita fluorescence bakterií se může během skladování měnit, nicméně výsledky testu při hodnocení procentuálního zastoupení fagocytujících buněk zůstávají nezměněny.
- Vzorky krve jsou považovány za potenciálně infekční materiál a musí s nimi být náležitě zacházeno. Pracujte výhradně v ochranných rukavicích a dodržujte postupy pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem. Využívejte se kontaktu vzorků s pokožkou, očima a sliznicemi.
- **Lysing Solution** (ED7040-3) obsahuje formaldehyd, metanol a diethylen glykol.  
H věty  
H302+312+332: Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží a při vdechování  
H315: Dráždí kůži.  
H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest.

H351: Podezření na vyvolání rakoviny.

H371: Může způsobit poškození orgánů.

H373: Může způsobit poškození ledvin při prodloužené nebo opakované expozici.

P věty

P270: Při používání tohoto výrobku nejzte, nepijte ani nekurte.

P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P301+312: PŘI POŽITÍ: Necitíte-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. Vymějte kontaktní čočky, jsou-li nasazené a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P501: Odstraňte obsah/obal v autorizovaném místě sběru nebezpečných odpadů.

• **Quenching Solution** (ED7040-2) obsahuje 0,08% roztok trypanové modři.

H věty

H350: Může vyvolat rakovinu.

P věty

P201: Před použitím si obstarejte speciální instrukce.

P270: Při používání tohoto výrobku nejzte, nepijte ani nekurte.

P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P301+P312: PŘI POŽITÍ: Necitíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302+P352: PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdlem.

P308+P313: PŘI expozici nebo podezření na: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

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.

• **Krev musí být odebrána do zkumavky s heparinem.** Antikoagulanty EDTA a citrát ruší stanovení.

• Vzorky krve zpracujte do 8 hodin po odběru.

• Reprodukovatelnost měření je závislá na dodržování inkubačních časů, inkubační teploty a na přesnosti pipetování.

• Průtokový cytometr denně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

• Průtokový cytometr může poskytovat nesprávné hodnoty, pokud není pravidelně kalibrován a udržován.

## Zamýšlené použití

Měření fagocytární aktivity lidských granulocytů a monocytů pomocí průtokové cytometrie.

## Příprava reagentů

### Wash Buffer

Naředte Wash Buffer před použitím roztokem PBS. Jako pomůcku pro správné ředění můžete použít uvedenou tabulku.

Počet vzorků krve	Celkem (ml)	Wash Buffer (ml)	PBS (ml)
10	200	8	192
100	2000	80	1920

Označte datem přípravy a skladujte při 2-8 °C po dobu maximálně 4 týdnů.

### Lysing Solution

Naředte Lysing Solution před použitím deionizovanou vodou. Jako pomůcku pro správné ředění můžete použít uvedenou tabulku.

Počet vzorků krve	Celkem (ml)	Lysing Solution (ml)	dH <sub>2</sub> O (ml)
10	40	4	36
100	400	40	360

Označte datem přípravy a skladujte při 2-25 °C po dobu maximálně 4 týdnů.

### E. coli FITC

Před použitím důkladně promíchejte obsah vialky na vortextu.

## Nutné pomůcky a přístroje

Nádobý a odměrné válce pro naředění reagentů

Vortex

Ledová lázeň (kostky ledu nebo drcený led)

Inkubační stojánky pro zkumavky

Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami

Inkubátor nebo vodní lázeň (37 °C)

Centrifuga s rotorem pro 5ml zkumavky

Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, detektory pro emisi záření 525 nm (FITC) a 617 nm (PE).

## Postup

Nechte vychladit **naředěný Wash buffer** (2-8 °C).

Nechte vytemperovat **naředěný Lysing solution** na laboratorní teplotu.

Umístěte **E. coli FITC, Quenching Solution a DNA Staining Solution** na led.

Připravte si nádobu s ledem a umístěte do ní stojánek na zkumavky.  
Pro každý vzorek krve si připravte dvě zkumavky:  
- reakce s *E. coli*  
- kontrolní reakce (bez *E. coli*)

1. Napipetujte **50 µl krve** do zkumavek.
2. Nechte zkumavky chladit 10 minut v ledové lázni.
3. Přidejte **10 µl E.coli-FITC** do zkumavky určené pro reakci s *E. coli* a promíchejte obsah na vortextu. Vratte zkumavku na led.
4. Do **kontrolních zkumavek** nepřidávejte nic.
5. Přeneste všechny zkumavky (i kontrolní) do inkubátoru nastaveného na 37 °C (nebo do vodní lázně nastavené na 37 °C).
6. Nechte inkubovat 30 minut (anebo 10 minut ve vodní lázni).
7. Vratte zkumavky na led a nechte 5 minut chladit.
8. Přidejte **100 µl vychlazeného Quenching Solution** (2-8 °C) a promíchejte obsah. Stále skladujte zkumavky na ledu.
9. Přidejte **3 ml vychlazeného naředěného Wash Buffer** (2-8 °C) a centrifugujte zkumavky při 200 g po dobu 5 minut.
10. Odsajte supernatant do nádoby s desinfekcí.
11. Opakujte promytí (krok 9 a 10).
12. Resuspendujte sediment na vortextu ve zbytkovém objemu promývacího pufru.
13. Přidejte **2 ml naředěného Lysing Solution** (laboratorní teplota), promíchejte a nechte inkubovat 20 minut při laboratorní teplotě chráněné před světlem.
14. Centrifugujte buňky při 200 g po dobu 5 min.
15. Odsajte supernatant.
16. Přidejte **3 ml naředěného Wash Buffer** (vychlazený) a centrifugujte buňky při 200 g po dobu 5 min.
17. Odsajte supernatant a resuspendujte sediment ve **300 µl vychlazeného DNA Staining Solution** (2-8 °C).
18. Nechte inkubovat 10 minut na ledu chráněné před světlem.
19. Změřte vzorky v průtokovém cytometru **během 2 hodin** od přidání DNA Staining Solution.

## Měření v průtokovém cytometru

### Nastavení cytometru před prvním měřením

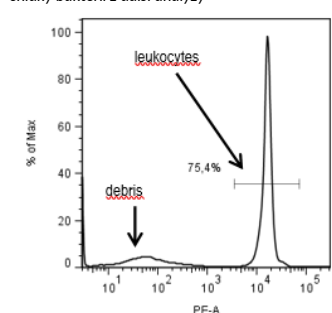
Pro nastavení kompenzace spektrálního přesvitu proveďte sérii jednobarevných reakcí se vzorkem krve. Pro jednobarevné reakce použijte v popsaném postupu jen jednu fluorescenční komponentu ze soupravy.

- a) Vzorek krve s *E. coli*-FITC (vynechte Quenching Solution a DNA Staining Solution)
  - b) Vzorek krve s Quenching Solution (vynechte *E. coli*-FITC a DNA Staining Solution)
  - c) Vzorek krve s DNA Staining Solution (vynechte *E. coli*-FITC a Quenching solution)
- Provedené reakce použijte k nastavení cytometru.

### Analýza vzorků

Nastavte si vhodný interval v detektoru pro PE (Obrázek 1) a nechte nahrát dostatečný počet silně fluorescenčních buněčných událostí (alespoň 10 000). Toto ohraničení odfiltruje debris a shluky bakterií z další analýzy.

Obr. 1 Ohraničení buněk, které odstraní debris a shluky bakterií z další analýzy



Zobrazte události spadající do intervalu v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) vytvořte ohraničení pro subpopulaci granulocytů a monocytů (Obrázek 2).

Potom zobrazte ohraničené subpopulace v histogramech fluorescence pro FITC (Obrázek 3a a 3b). Použijte histogram z kontrolní reakce pro umístění diskriminační hranice. Obvyčejně dostačuje jedno společné nastavení diskriminační hranice pro vyhodnocení všech právě vyšetřovaných vzorků.

Fig. 2 Ohraničení subpopulací granulocytů a monocytů

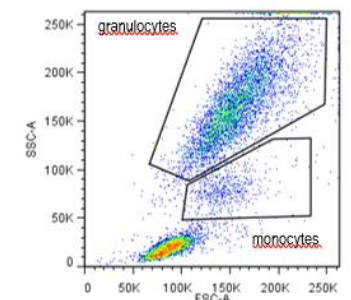


Fig. 3a Histogramy granulocytů z reakce s *E. coli* a z kontrolní reakce přeložené přes sebe

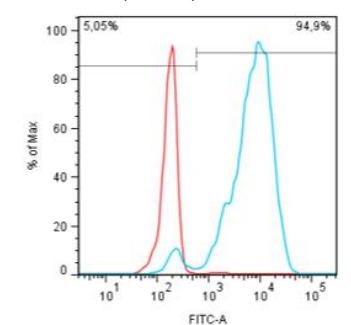
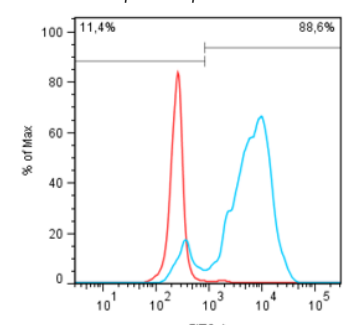


Fig. 3b Histogramy monocytů z reakce s *E. coli* a z kontrolní reakce přeložené přes sebe



Výsledky lze interpretovat podle

- 1) procentuálního zastoupení fagocytů, které obsahují fluorescenční *E. coli* nebo
- 2) střední hodnoty fluorescence fagocytujících buněk.

Procentuální zastoupení aktivních fagocytů je nazýváno **fagocytární aktivita**. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty procentuálního zastoupení aktivně fagocytujících buněk, které byly spočítané z dat získaných analýzou vzorků krve od zdravých dárců.

Subpopulace buněk	% aktivních buněk (průměr +/- 2SD)
Granulocyty	91 (83-100)
Monocyty	82 (72-94)

## Opakovatelnost

Opakovatelnost pro stanovení procentuálního zastoupení aktivně fagocytujících buněk byla vypočítána z výsledků měření čtyř paralelních reakcí vzorků krve od zdravých dárců. Variabilita je vyjádřena průměrným koeficientem variability.

	% aktivních buněk (rozsah)	průměrný CV (%)
Granulocyty	83-97	1,8
Monocyty	73-91	4,8

## Odkazy

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

## Výrobce

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

[info@exbio.cz](mailto:info@exbio.cz)  
[technical@exbio.cz](mailto:technical@exbio.cz)  
[orders@exbio.cz](mailto:orders@exbio.cz)  
[www.exbio.cz](http://www.exbio.cz)

## Ochranné známky

n/a

## Historie revizí

- Verze 1, ED7040\_TDS\_v1

První vydání

- Verze 2, ED7040\_TDS\_v2

Změna ředění Wash buffer, namísto ředění deionizovanou vodou (dH<sub>2</sub>O) doporučeno ředění provádět fosfátem pufovaným fyziologickým roztok (PBS).

Odkaz na konkrétní nařízení byl odstraněn z výstrah "Směs je klasifikována jako nebezpečná ve smyslu zákona č. 350/2011 Sb".

- Verze 3, ED7040\_TDS\_v3

Nové byly použity GHS symboly, H- a P- věty.

- Verze 4, ED7040\_TDS\_v4

Opravy formátování.

- Verze 5, ED7040\_TDS\_v5

Změna loga výrobce a vzhledu technického listu. Nové použité symboly pro "Čtěte návod k použití", "Chránit před slunečním zářením" a "Pouze pro výzkumné účely. Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury" symbols were added to Symbols. Změna PSČ výrobce z 25242 na 25250

- Verze 6, ED7040\_TDS\_v6

Byl upřesněn text definující omezení použití produktu.

## Symbole



Katalogové číslo



Kód dávky



Použit do data



Omezení teploty



Čtěte návod k použití



Chránit před slunečním zářením



Výrobce



Pouze pro výzkumné účely.  
Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury.

# exbio

## IngoFlowEx Kit

100 testů | Kat. č. ED7040

**Pouze pro výzkumné účely.**

**Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury.**

## Technický list

Verze ED7040\_TDS\_v6\_CS

Datum vydání: 20-04-2020

CS

Produkt je určen pouze pro výzkumné účely. 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](http://www.exbio.cz). EXBIO, EXBIO Logo a všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti EXBIO Praha, a.s.