IngoFlowEx Kit
100 testů | Kat. č. ED7040

RUO

Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury.

Technický list (CS)

Verze: ED7040_TDS_v7_CS

Datum vydání: 20-12-2024

Symboly použité k označení produktu

RUO	Pouze pro výzkumné účely		Chránit před vlhkem
	Výrobce		Pozor
	Čtěte návod k použití	CONC 10×	Koncentrovaný roztok (10x)
	Obsah postačuje pro <n> testů	CONC 25×	Koncentrovaný roztok (25x)
REF	Katalogové číslo	CONTENTS	Obsah
LOT	Kód dávky		
	Použití do data		
	Omezení teploty		
	Chránit před slunečním zářením		

Popis

Výrobek je určen pouze pro výzkumné účely. Diagnostické nebo terapeutické použití je přísně zakázáno.

IngoFlowEx Kit je určený pro vyšetření **fagocytární aktivity granulocytů a monocytů** měřením ingesce fluorescenčně značených bakterií *E. coli* v plné heparinizované 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 intensity fluorescence buněk, které pohltily fluorescenčně značené bakterie *E. coli* FITC. Vzorek heparinizované krve se smíchá s fluorescenční *E. coli* a inkubuje se při 37 °C. Negativní kontrola bez *E. coli* se používá k nastavení rozlišovací hranice mezi fagocytujícími a nefagocytujícími buňkami. Nepohlcené bakterie se odstraní opakovaným promytím. Jakékoli zbývající extracelulární nebo povrchově vázané bakterie jsou uhašeny pomocí trypanové modři, životně důležitého barviva, které neproniká buněčnou membránou. Erytrocyty se lyzují, buňky se fixují a DNA se obarví propidium jodidem, aby se buňky s jádry odlišily od úlomků nebo shluků bakterií. Bakterie *E. coli* použité v testu byly opsonizovány lidskou AB plazmou, což zajišťuje, že výsledky nejsou primárně závislé na opsonizační aktivitě testovaného vzorku krve.

Poskytované materiály

Obsah

Produkt IngoFlowEx Kit vystačí na provedení 100 testů a je dodáván ve formátu:

E. coli FITC ED7040-1 (1 lahvička) obsahující 1 ml fluorescenčně značených bakterií *E. coli* kmene K-12 opsonizovaných lidskou plazmou.

Quenching Solution ED7040-2 (1 láhev) obsahující 20 ml 0,2% roztoku trypanové modři.

Lysing Solution ED7040-3 (1 láhev) obsahující 60 ml 10X koncentrovaného lyzačního roztoku s fixačním prostředkem.

Wash Buffer ED7040-4 (1 láhev) obsahující 80 ml 25X koncentrovaného promývacího roztoku.

DNA Staining Solution ED7040-5 (1 láhev) obsahující 60 ml roztoku propidium jodidu.

Nutné, ale neposkytované materiály

Testovací zkumavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr (1× PBS), pH 7,2 – 7,4

Nutná zařízení

Automatická pipeta s jednorázovými špičkami (10 µl – 5 ml) pro pipetování vzorků a činidel

Termální inkubátor nebo vodní lázeň (37 °C)

Ledová lázeň (kostky ledu nebo drcený led)

Nádoby a odměrné válce pro naředění reagencií

Stojan na zkumavky

Vortex mixer

Centrifuga

Průtokový cytometr s laserovým excitačním zdrojem (488 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů z fluorochromů uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v produktu

Flurochrom	Excitace [nm]	Emise [nm]
FITC	488	525
Propidium iodid	488	636

Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

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 Postup (Příprava reagencií).

Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VÝSTRAHA: Quenching Solution (ED7040-2) obsahuje trypanovou modř (č. 72-57-1) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Nebezpečí
H-věty	H350: Může vyvolat rakovinu.
P-věty	P201: Před použitím si obstarejte speciální instrukce. P280: Používejte ochranné rukavice. P308+P313: PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P405: Skladujte uzamčené. P501: Odstraňte obsah/obal předáním oprávněné osobě k nakládání s odpady nebo vrácením dodavateli.

VÝSTRAHA: Lysing Solution (ED7040-3) obsahuje formaldehyd (č. 50-00-0), methanol (č. 67-56-1) a diethylenglykol (č. 111-46-6) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
 	Nebezpečí
H-věty	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. H371: Může způsobit poškození orgánů. H373: Může způsobit poškození ledvin při prodloužené nebo opakované expozici při požití. H302+H312+H332: Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží nebo při vdechování.

P-věty	P201: Před použitím si obstarejte speciální instrukce. P260: Nevdechujte páry. P264: Po manipulaci důkladně omyjte ruce a zasažené části těla. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít. P301+P312: PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P302+P352: PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. P305+P351+P338:PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vypl achujte 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. P314: Necítíte-li se dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

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 reagencie Lysing Solution je čirá kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Normální vzhled reagencie Wash Buffer je čirá kapalina. Pokud zaznamenáte známky precipitace, přiveďte roztok na pokojovou teplotu a nechte sraženinu rozpustit.

Normální vzhled reagencie Quenching Solution je tmavě modrá kapalina. Pokud zaznamenáte známky přecipitace, přiveďtě roztok na pokojovou teplotu a nechte sraženinu rozpustit.

Normální vzhled E. coli FITC je opalická světle žlutá kapalina s resuspendovatelným sedimentem.

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

Vzorek

Použijte periferní krev odebranou do zkumavky klasifikované jako zdravotnický prostředek s antikoagulantem heparin. Antikoagulanty EDTA a citrát ruší stanovení.

Vzorky krve zpracujte do 8 hodin po odběru. Vzorek skladujte při laboratorní teplotě (20-25 °C). Neuchovávejte vzorek v chladničce.

Postup

Příprava reagencií

Wash Buffer

Wash Buffer nařeďte roztokem PBS a skladujte při 2-8 °C. Na jednu zkumavku je potřeba minimálně 9 ml (18 ml/test). Po prvním otevření si reagencie zachovává své funkční charakteristiky až do data exspirace, pokud je skladována za uvedených podmínek v původní primární nádobě.

Zředěný promývací pufr (1X) je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud je skladován v dávkovači kapaliny nebo uzavřené nádobě při teplotě 2-8 °C.

Použijte následující tabulku jako rychlý návod k požadovanému objemu.

Počet vzorků krve	Celkem (ml)	Wash Buffer (ml)	PBS (ml)
10	200	8	192

Lysing Solution

Lysing Solution nařeďte deionizovanou vodou a skladujte při 2-8 °C nebo při pokojové teplotě. Na jednu zkumavku je potřeba minimálně 2 ml (4 ml/test).

Po prvním otevření si reagencie zachovává své funkční charakteristiky až do data exspirace, pokud je skladována za uvedených podmínek v původní primární nádobě. Zředěný lyzační roztok (1X) je stabilní po dobu 1 měsíce při skladování v dávkovači kapaliny nebo uzavřené nádobě při 2-8 °C nebo při pokojové teplotě.

Použijte následující tabulku jako rychlý návod k požadovanému objemu.

No. of samples	Total (ml)	Lysing Solution (ml)	dH_2O (ml)
10	40	4	36

E. coli FITC

Umístěte činidlo do ledové lázně nebo uchovávejte činidlo v chladničce.

Quenching Solution

Umístěte činidlo do ledové lázně nebo uchovávejte činidlo v chladničce.

DNA Staining Solution

Umístěte činidlo do ledové lázně nebo uchovávejte činidlo v chladničce.

Příprava dalšího zařízení

Připravte stojan na zkumavky s kulatým dnem (12 × 75 mm) a vložte jej do ledové lázně.

Stimulace vzorku

1. Pro každý vzorek si připravte dvě zkumavky s kulatým dnem (12 × 75 mm).

   Označte každou testovací zkumavku identifikačním údajem vzorku a podle stimulace:

   - E. coli – vzorek inkubovaný s fluorescenčními bakteriemi,
   - Negativní kontrola – vzorek inkubovaný bez bakterií E. coli.

2. Pipetujte 50 µl dobře promýchané krve na dno testovací zkumavky.

   Vzorky ve zkumavkách chlaďte 10 minut v ledové lázni.

3. Přidejte 10 µl dobře promýchané E. coli-FITC do zkumavky označené E. coli.

   Promíchejte na vortexu a zkumavku vraťte do ledové lázně.

   Do kontrolních zkumavek nepřidávejte nic.

4. Přeneste všechny zkumavky (i kontrolní) do 37 °C a inkubujte:

   - po dobu 30 minut v inkubátoru případně
   - 10 minut ve vodní lázni.

5. Vraťte zkumavky na led a nechte 5 minut chladit.

Postup značení

1. Přidejte 100 µl vychlazeného Quenching Solution na dno testovací zkumavky.

   Promíchejte obsah na vortexu.

2. Promytí:

   Přidejte 3 ml vychlazeného naředěného (1X) Wash Buffer.

   Centrifugujte po dobu 5 minut při 200× g, supernatant vylijte do nádoby s desinfekčním prostředkem.

   POZNÁMKA: Centrifugace při 2-8 °C činí buněčnou peletu příliš pevnou a erytrocyty jsou částečně odolné vůči lýzi. Postup byl navržen pro centrifugy bez možnosti chlazení.

3. Opakujte promytí:

   Přidejte 3 ml vychlazeného naředěného (1X) Wash Buffer.

Centrifugujte po dobu 5 minut při 200× g, supernatant vylijte do nádoby s desinfekčním prostředkem. Resuspendujte buněčnou peletu ve zbytkovém objemu pomocí vortexu.

4. Přidejte 2 ml naředěného (1X) Lysing Solution (laboratorní teplota) a v případě potřeby pipetou nasátím nahoru a dolů resuspendujte zbývající agregáty.

   Inkubujte 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.

5. Centrifugujte po dobu 5 minut při 200× g, odsajte supernatant.

6. Závěrečné promití:

   Přidejte 3 ml studeného naředěného (1X) Wash Buffer.

   Centrifugujte po dobu 5 minut při 200× g, odsajte supernatant.

7. Resuspendujte sediment ve 300 µl vychlazeného DNA Staining Solution a inkubujte na ledu ve tmě po dobu 10 minut.

8. Obarvený vzorek okamžitě změřte pomocí průtokového cytometru. Pokud obarvený vzorek nebude změřen okamžitě, uchovávejte při 2-8 °C v temnu a analyzujte do 2 hodin.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s produktem IngoFlowEx 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 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.

Kompenzujte fluorescenční signály mezi detektory před nebo po sběru dat. Pokud jsou fluorescenční signály nesprávně kompenzovány nebo pokud jsou regiony (gates) umístěny nepřesně, mohou být data nesprávně interpretována.

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

Chcete-li analyzovat dostatečný počet fagocytárních buněk (~3 000 neutrofilů), nasbírejte alespoň 10 000 leukocytů (události barvené propidium jodidem) na vzorek.

Stanovení přesvitu fluorescence a nastavení kompenzace cytometru

Při standardním nastavení cytometru není spektrální překrývání vážným problémem, ale v případě potřeby lze přesvit mezi detektory použitými při měřeních IngoFlowEx Kit určit provedením sady jednosložkových obarvených reakcí se vzorkem od zdravého dárce krve.

1. Vzorek krve inkubovaný s E. coli FITC a zpracovaný podle protokolu, ale bez přidání Quenching Solution a DNA Staining Solution.
2. Vzorek krve inkubovaný bez E. coli FITC a zpracovaný podle protokolu (s roztokem Quenching Solution), ale bez přidání DNA Staining Solution.
1. Vzorek krve inkubovaný bez E. coli FITC a zpracovaný podle protokolu (s DNA Staining Solution), ale bez přidání Quenching Solution.

Zaznamenejte intenzity fluorescence pro každý kanál a upravte nastavení kompenzace na základě hodnot překrytí vypočítaných z měření.

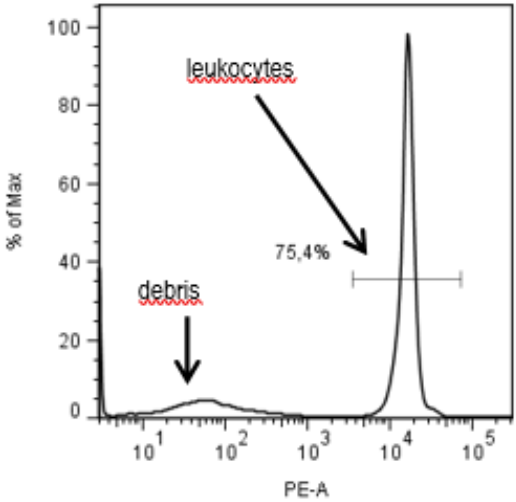
Analýza dat

Zobrazte data jako histogram, kde osa X představuje PE kanál intenzity fluorescence.

POZNÁMKA: Chcete-li analyzovat dostatečný počet fagocytárních buněk (~3 000 neutrofilů), získejte alespoň 10 000 leukocytů PE světlé události, tj. události barvené propidium jodidem, na vzorek.

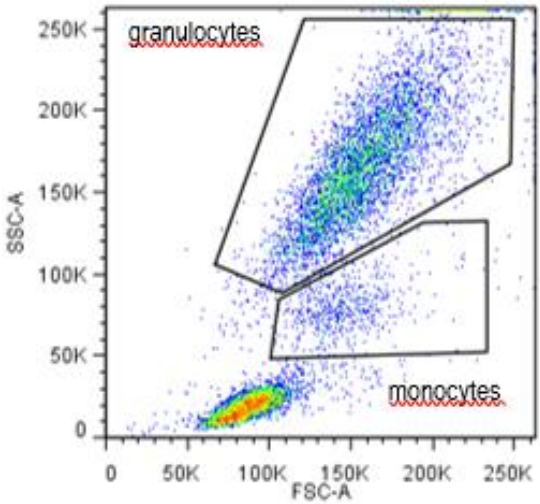
Vytvořte ohraničení, které vylučuje dim události (debris a bakteriální shluky) z další analýzy (obrázek 1).

Obrázek 1 Ohraničení leukocytů (PE světlé události) k vyloučení debris a bakteriálních shluků z další analýzy.



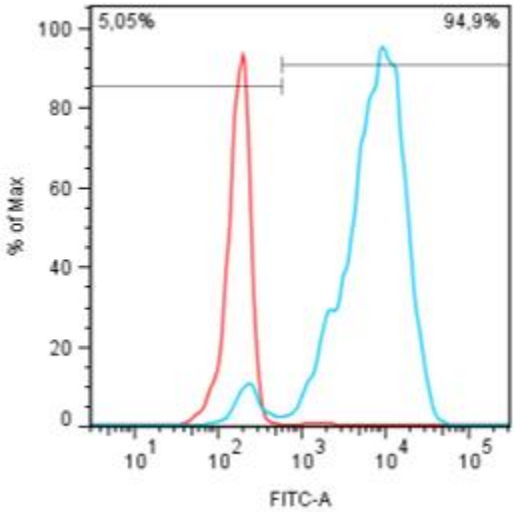
Zobrazte leukocyty v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Nastavte ohraničení pro granulocyty a monocyty (obrázek 2).

Obrázek 2 Ohraničení granulocytů a monocytů.
(data získaná na BD FACSCanto™)

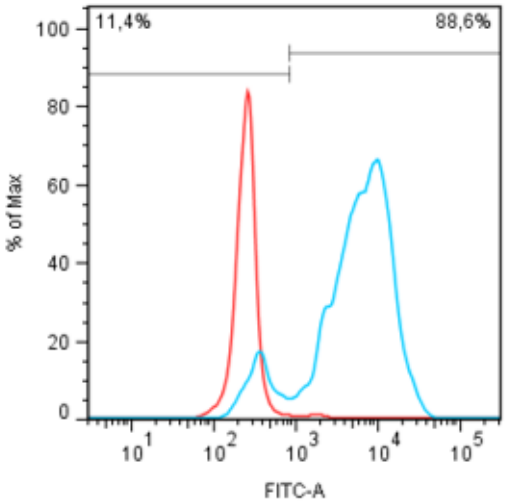


Zobrazte granulocyty a monocyty jako histogramy, kde osa X představuje intenzitu fluorescence v kanálu FITC. Použijte negativní kontrolu k nastavení rozlišovacího gatu mezi nefagocytujícími (FITC negativní) a fagocytujícími (FITC pozitivní) buňkami.

Obrázek 3a Překrytí granulocytů jako histogram intenzity fluorescence kanálu FITC z negativní kontroly (červená čára) a z reakce E. coli FITC (modrá čára).



Obrázek 3b Překrytí monocytů jako histogram intenzity fluorescence kanálu FITC z negativní kontroly (červená čára) az reakce E. coli FITC (modrá čára).



Interpretace dat

1) Procento fagocytujících buněk (obsahujících fluorescenční bakterie *E. coli*) nebo
2) Množství požitých bakterií porovnáním průměrné fluorescence fagocytujících buněk mezi vzorky.

POZNÁMKA: Bakterie jsou dodávány v suspenzi a průměrná intenzita fluorescence bakterií se během skladování snižuje. Srovnání mezi množstvím požitých bakterií lze provést pouze v případě, že vzorky byly testovány ve stejný den.

Očekávané hodnoty

Průměrné hodnoty aktivně fagocytujících buněk byly stanoveny vyšetřením vzorků od třinácti zdravých dárců krve.

Subpopulace buněk	Procento fagocytujících buněk Průměr (+/- 2SD)
Granulocyty	91 (83-100)
Monocyty	82 (72-94)

Opakovatelnost

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

	Naměřený rozsah (procento fagocytujících buněk)	CV (%) (min-max)
Granulocyty	83-97	1,8 (0,1-4,9)
Monocyty	73-91	4,8 (1,0-15,8)

Odkazy

1) 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.

Použití ochranných známek třetích stran

FlowJo™ a FACSCanto™ jsou registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson a Company, VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L..

Historie revizí

Verze 7, ED7040_TDS_v7

Uspořádání TDS bylo změněno.

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

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