

exbio

IngoFlowEx Kit

100 pruebas | Cat. N°. ED7040

RUO

No lo utilice para procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.

Listado técnico (ES)

Versión: ED7040_TDS_v8_ES

Fecha de emitido: 10-02-2026

Símbolos utilizados en el etiquetado del dispositivo

	Solo para fines de investigación. No lo utilice para procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.		Mantener seco Mantener alejado de la lluvia
	Fabricante		Precaución
	Consulte las instrucciones de uso		Solución concentrada (10x)
	Contiene suficientes para <n> pruebas		Solución concentrada (25x)
	Número de catálogo		Contenido
	Código de lote		
	Fecha de caducidad		
	Límite de temperatura		
	Mantener apartado de la luz del sol		

Descripción

El producto solo es para uso de investigación. Las aplicaciones diagnósticas o terapéuticas están estrictamente prohibidas.

IngoFlowEx Kit está diseñado para cuantificar la **actividad fagocítica de los granulocitos y monocitos humanos** mediante la medición de la ingestión de bacterias *E. coli* marcadas con fluorescencia en sangre total humana heparinizada, utilizando la citometría de flujo.

La fagocitosis es una parte de los mecanismos de defensa innatos en la que los fagocitos ingieren material particulado extracelular. La capacidad de fagocitosis es un rasgo característico de las denominadas células fagocíticas profesionales (granulocitos neutrófilos y eosinófilos, monocitos y macrófagos). El proceso incluye la unión de partículas, su ingestión y posterior degradación. Las proteínas plasmáticas (C3b y anticuerpos) ayudan a los fagocitos a reconocer e ingerir las partículas cubriendo la superficie de las partículas extrañas con ligandos fácilmente reconocibles.

La prueba se basa en la medición de la fluorescencia de las células que ingirieron *E. coli* marcada con FITC. Se mezcla una muestra de sangre heparinizada con *E. coli* fluorescente y se incuba a 37 °C. Se utiliza un control negativo sin *E. coli* para establecer el límite de discriminación entre células fagocitadoras y no fagocitadoras. Las bacterias no ingeridas se eliminan mediante lavados repetidos. Los restos de bacterias extracelulares o adheridas a la superficie se apagan con azul tripán, un colorante vital que no penetra en la membrana celular. Los eritrocitos se lisan, las células se fijan y el ADN se tiñe con yoduro de propidio para diferenciar las células nucleadas de los restos o grupos de bacterias. Las bacterias *E. coli* utilizadas en la prueba se opsonizaron con plasma AB humano, lo que garantiza que los resultados no dependen principalmente de la actividad opsonizante de la muestra de sangre analizada.

Reactivo(s) suministrado(s)

Contenido

El producto IngoFlowEx Kit es suficiente para 100 pruebas y se suministra con los siguientes reactivos:

E. coli FITC ED7040-1 (1 vial) que contiene 1 ml de *E. coli* cepa K-12 marcada con fluoresceína y opsonizada con plasma humano.

Quenching Solution ED7040-2 (1 botella) que contiene 20 ml de solución de azul tripán al 0,2 %.

Lysing Solution ED7040-3 (1 botella) que contiene 60 ml de una solución de lisis concentrada 10X con fijador.

Wash Buffer ED7040-4 (1 botella) que contiene 80 ml de una solución concentrada 25X.

DNA Staining Solution ED7040-5 (1 botella) que contiene 60 ml de solución de yoduro de propidio.

Materiales necesarios pero no proporcionados

- Tubos de ensayo de fondo redondo (12 x 75 mm)
- Agua desionizada (de calidad reactiva)
- Solución salina tamponada con fosfato (1x PBS), pH 7,2 – 7,4

Equipamiento necesario

- Pipeta automática con puntas desechables (10 µl – 5 ml) para pipetear muestras y reactivos
- Incubadora térmica o baño de agua (37 °C)
- Baño de hielo (cubitos o hielo picado)
- Cilindros y vasos de precipitados para diluir los reactivos
- Gradillas para los tubos de ensayo
- Mezclador vórtex
- Centrífuga
- Citómetro de flujo con fuente de excitación láser (488 nm), detectores de luz dispersa, filtros ópticos y detectores de emisión adecuados para recoger las señales de los fluorocromos indicados en la tabla 2.

Tabla 2 Características espectrales de los fluorocromos utilizados en el producto

Fluorocromo	Excitación [nm]	Emisión [nm]
FITC	488	525
Yoduro de propidio	488	636

Almacenamiento y manipulación

- Almacenar a 2-8 °C.
- Evitar la exposición prolongada a la luz.
- Consulte la sección Procedimiento (Preparación de los reactivos suministrados) para obtener información sobre las condiciones de almacenamiento y la estabilidad de las soluciones de trabajo (si procede).

Advertencias, precauciones y limitaciones de uso

Clasificación de peligrosidad del SGA

ADVERTENCIA: Quenching Solution (ED7040-2) contiene azul tripán (n.º CAS 72-57-1) en concentraciones clasificadas como peligrosas.

Elementos de etiquetado	Palabra de señal
	Peligro
Frases H	H350: Puede provocar cáncer.
Frases P	P201: Pedir instrucciones especiales antes del uso. P280: Llevar guantes de protección. P308+P313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. P405: Guardar bajo llave. P501: Eliminar el contenido/el recipiente en mediante la entrega a la persona autorizada para el tratamiento con los residuos o devolviéndolo al suministrador.

ADVERTENCIA: Lysing Solution (ED7040-3) contiene formaldehído (n.º CAS 50-00-0), metanol (n.º CAS 67-56-1) y 2,2'-oxibisetanol (n.º CAS 111-46-6) en concentraciones clasificadas como peligrosas.

Elementos de etiquetado	Palabra de señal
	Peligro
	
Frases H	H302: Nocivo en caso de ingestión. H315: Provoca irritación cutánea. H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H319: Provoca irritación ocular grave. H331:Tóxico en caso de inhalación. H335: Puede irritar las vías respiratorias. H341: Se sospecha que provoca defectos genéticos. H350: Puede provocar cáncer.

	H371: Puede provocar daños en los órganos. H373: Puede provocar daños en los riñones tras exposiciones prolongadas o repetidas en caso de ingestión. EUH071: Corrosivo para las vías respiratorias.
Frases P	P201: Pedir instrucciones especiales antes del uso. P260: No respirar los vapores. P280: Llevar guantes/gafas/máscara de protección. P308+P313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. P403+P233: Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente herméticamente cerrado.

Consulte la Ficha de Datos de Seguridad (FDS) disponible en la página del producto en www.exbio.cz para obtener toda la información sobre los riesgos que plantean las sustancias y mezclas químicas contenidas en el Producto y cómo deben manipularse y eliminarse.

Peligro biológico

Las muestras biológicas humanas y los especímenes sanguíneos, así como cualquier material que entre en contacto con ellos, se consideran siempre materiales infecciosos.

Utilizar equipo de protección personal y de seguridad para evitar el contacto con la piel, los ojos y las mucosas.

Siga todas las leyes, reglamentos y procedimientos aplicables para la manipulación y eliminación de materiales infecciosos.

Pruebas de deterioro

El aspecto normal de la Lysing Solution es un líquido claro. No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto, por ejemplo, turbidez o signos de precipitación.

La apariencia normal del Wash Buffer es la de un líquido claro. Si encuentra signos de precipitación, lleve la solución a temperatura ambiente y deje que el precipitado se disuelva.

El aspecto normal de la Quenching Solution es el de un líquido azul oscuro. Si encuentra signos de precipitación, lleve la solución a temperatura ambiente y deje que el precipitado se disuelva.

El aspecto normal del E. coli FITC es un líquido amarillo claro opalescente con un sedimento resuspendible.

Limitación de uso

No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del producto.

Muestra

Utilice sangre periférica recogida en recipiente para muestras clasificado como producto sanitario con anticoagulante de heparina. Los anticoagulantes EDTA y citrato afectan negativamente a los resultados del análisis.

Las muestras de sangre deben medirse en las 8 horas siguientes a su recogida. La muestra de sangre en el tubo de recogida debe conservarse a temperatura ambiente (20-25 °C). No la refrigere.

Procedimiento

Preparación de reactivo(s) suministrado(s)

Wash Buffer

Diluya el Wash Buffer con PBS y consérvelo a 2-8 °C. Se necesita un mínimo de 9 ml por tubo de ensayo (18 ml por ensayo de muestra). Tras la primera apertura, el reactivo conserva sus características de funcionamiento hasta la fecha de caducidad si se almacena en las condiciones indicadas en su envase primario original. El Wash Buffer diluido (1X) es estable durante 1 mes si se almacena en un dispensador de líquidos o en un recipiente cerrado a 2-8 °C.

Utilice la siguiente tabla como guía rápida para saber el volumen necesario.

N.º de tubos de ensayo	Total (ml)	Wash Buffer (ml)	PBS (ml)
10	200	8	192

Lysing Solution

Diluya la Lysing Solution con agua desionizada y consérvela a 2-8 °C o a temperatura ambiente. Se necesita un mínimo de 2 ml por tubo de ensayo (4 ml por muestra de ensayo). Tras la primera apertura, el reactivo conserva sus características de funcionamiento hasta la fecha de caducidad si se almacena en las condiciones indicadas en su envase primario original. La Lysing Solution diluida (1X) es estable durante 1 mes si se almacena en un dispensador de líquidos o en un recipiente cerrado a 2-8 °C o a temperatura ambiente.

Utilice la siguiente tabla como guía rápida para saber el volumen necesario.

N.º de muestras	Total (ml)	Lysing Solution (ml)	dH ₂ O (ml)
10	40	4	36

E. coli FITC

Coloque el reactivo en el baño de hielo o consérvelo en el frigorífico.

Quenching Solution

Coloque el reactivo en el baño de hielo o consérvelo en el frigorífico.

DNA Staining Solution

Coloque el reactivo en el baño de hielo o consérvelo en el frigorífico.

Preparación de otros equipos

Prepare una gradilla para los tubos de ensayo de fondo redondo (12 x 75 mm) y colóquela en un baño de hielo.

Protocolo de estimulación de muestras

1. Para cada muestra, prepare dos tubos de ensayo de fondo redondo (12 × 75 mm).

Etiquételas según la identificación de la muestra y según la estimulación:

- E. coli: una muestra incubada con bacterias fluorescentes,
- Control negativo: muestra incubada sin bacterias *E. coli*.

2. Pipetee 50 µl de muestra de sangre bien mezclada en el fondo de los tubos de ensayo.

Enfríe las muestras en tubos durante 10 minutos en el baño de hielo.

3. Añadir 10 µl de E. coli FITC bien mezclado al tubo etiquetado con E. coli.

Agite para mezclar y volver a introducir el tubo en el baño de hielo.

No añada nada en el tubo de control negativo.

4. Transfiera la gradilla con los tubos a 37 °C e incube:

- durante 30 minutos en una incubadora térmica o
- durante 10 minutos en un baño de agua.

5. Vuelva a poner los tubos en hielo durante 5 minutos.

Protocolo de tinción de muestras

1. Pipetee 100 µl de Quenching Solution fría en el fondo de los tubos de ensayo.

Agite para mezclar el contenido.

2. Lave:

Añada 3 ml de Wash Buffer diluido en frío (1X).

Centrifugue durante 5 minutos a 200× g, deseche el sobrenadante en un recipiente con un desinfectante adecuado.

AVISO: la centrifugación a 2-8 °C hace que el pellet celular sea demasiado firme y, en consecuencia, los eritrocitos son parcialmente resistentes a la lisis. El procedimiento se ha diseñado para centrifugadoras sin capacidad de refrigeración.

3. Repita el lavado:

Añada 3 ml de Wash Buffer diluido en frío (1X).

Centrifugue durante 5 minutos a 200× g, deseche el sobrenadante en un recipiente con un desinfectante adecuado. Vuelva a suspender el sedimento celular en el volumen residual utilizando un agitador vórtex.

4. Añada 2 ml de Lysing Solution diluida (1X) a temperatura ambiente y, si es necesario, pipetee arriba y abajo para volver a suspender los agregados restantes.

Incube durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

5. Centrifugue durante 5 minutos a 200× g, deseche el sobrenadante.

6. Lavado final:

Añada 3 ml de Wash Buffer diluido en frío (1X).

Centrifugue durante 5 minutos a 200× g, deseche el sobrenadante.

7. Vuelva a suspender el sedimento celular en 300 µl de DNA Staining Solution fría e incube en hielo en la oscuridad durante 10 minutos.

8. Tome inmediatamente la muestra teñida utilizando el citómetro de flujo. Si la muestra teñida no se va a tomar inmediatamente, guárdela a 2-8 °C en la oscuridad y analícela en un plazo de 2 horas.

Análisis por citometría de flujo

El citómetro de flujo seleccionado para usar con el producto IngoFlowEx Kit se calibrará de forma rutinaria utilizando microperlas fluorescentes para garantizar una sensibilidad estable de los detectores de acuerdo con las instrucciones del fabricante del citómetro.

Si no se mantiene adecuadamente, el citómetro de flujo puede producir resultados falsos.

Consulte las especificaciones del fabricante del citómetro para láseres y detectores de fluorescencia según las características de excitación y emisión de los fluorocromos en la sección Equipo necesario.

Ajuste la tensión de los detectores de fluorescencia de interés antes del análisis de

la muestra tintada. La tensión de un detector PMT debe ajustarse lo suficientemente alta, para que el mínimo de eventos de tinción interfiera negativamente con el canal 0 en el eje de fluorescencia. Además, la tensión del detector PMT no debe superar los valores en los que los eventos positivos se presionan hacia el eje derecho.

Compense las señales de fluorescencia entre detectores antes o después de la obtención de datos. Los datos se pueden interpretar incorrectamente si las señales de fluorescencia no se compensan correctamente o si las puertas se colocan de forma incorrecta.

Para el análisis de datos medidos, es posible utilizar software de citómetro desarrollado por el fabricante, o software dedicado para el análisis de datos de citometría fuera de línea (por ejemplo FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Para analizar un número suficiente de células fagocíticas (~3,000 neutrófilos), tome al menos 10 000 leucocitos (eventos teñidos con yoduro de propidio) por muestra.

Determinación del desbordamiento de fluorescencia y ajuste de la compensación del citómetro

En una configuración de citómetro estándar, el solapamiento espectral no es un problema grave, pero si es necesario, el desbordamiento entre los detectores utilizados en las mediciones del IngoFlowEx Kit se puede determinar realizando un conjunto de reacciones teñidas de un solo componente con una muestra de un donante de sangre sano.

1. Una muestra de sangre incubada con E. coli FITC y procesada de acuerdo con el protocolo pero sin añadir la Quenching Solution y la DNA Staining Solution.
2. Una muestra de sangre incubada sin E. coli FITC y procesada según el protocolo (con Quenching Solution), pero sin añadir la DNA Staining Solution.
3. Una muestra de sangre incubada sin E. coli FITC y procesada según el protocolo (con DNA Staining Solution), pero sin añadir la Quenching Solution.

Registre las intensidades de fluorescencia de cada canal y ajuste la configuración de compensación basándose en los valores de solapamiento calculados a partir de las mediciones.

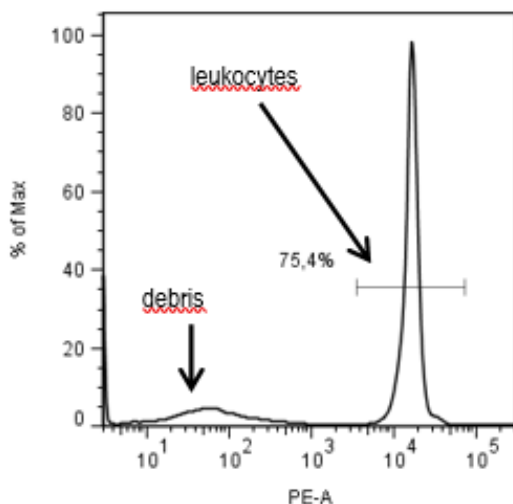
Análisis de datos

Visualice los datos como un histograma donde el eje X representa la intensidad de fluorescencia del canal PE.

AVISO: para analizar un número suficiente de células fagocíticas (~3,000 neutrófilos), tome al menos 10 000 leucocitos PE brillantes, es decir, teñidos con yoduro de propidio, por muestra.

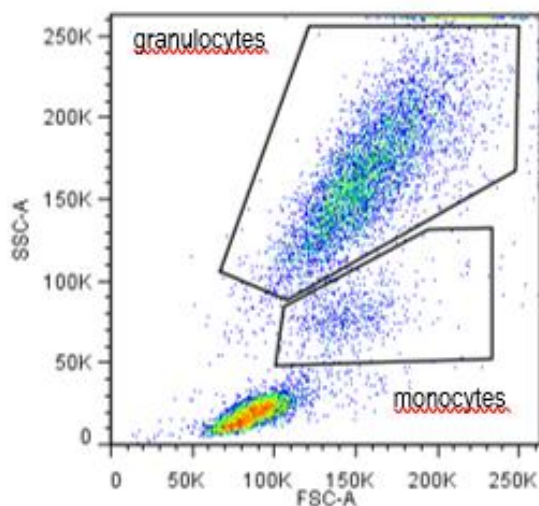
Cree una puerta que excluya los eventos tenues (restos y aglomeraciones de bacterias) del análisis posterior (Figura 1).

Figura 1 Seleccione poblaciones de leucocitos (eventos PE brillantes) para excluir restos y corpúsculos bacterianos de análisis posteriores.



Visualice los leucocitos en el gráfico de dispersión lateral (SSC) frente a la dispersión frontal (FSC). Establezca puertas para granulocitos y monocitos (Figura 2).

Figura 2 Delineación de granulocitos y monocitos.
(datos obtenidos en BD FACSCanto™)



Visualice los granulocitos y monocitos como histogramas donde el eje X representa la intensidad de fluorescencia en el canal FITC. Utilice el control negativo para establecer la puerta de discriminación entre células no fagocitadoras (FITC negativo) y fagocitadoras (FITC positivo).

Figura 3a Superposición de granulocitos como histograma de intensidad de fluorescencia del canal FITC del control negativo (línea roja) y de la reacción FITC de E. coli (línea azul).

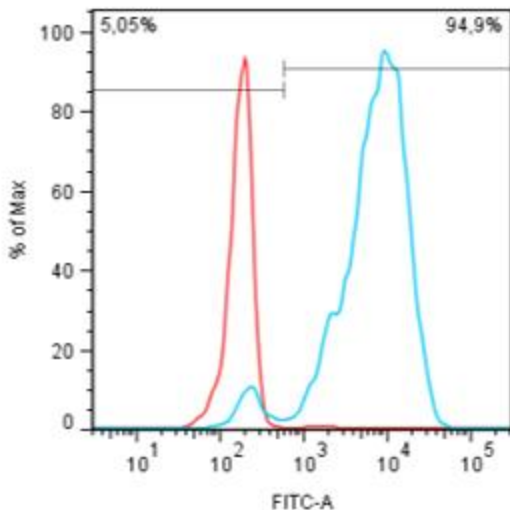
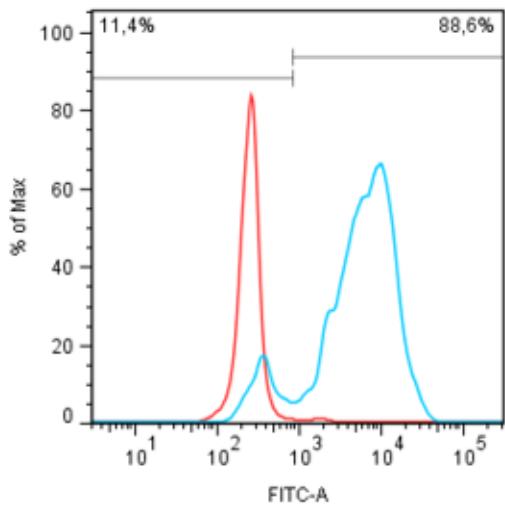


Figura 3b Superposición de monocitos como histograma de intensidad de fluorescencia del canal FITC del control negativo (línea roja) y de la reacción FITC de E. coli (línea azul).



Interpretación de los datos

- 1) Porcentaje de células fagocitadoras (que contienen bacterias *E. coli* fluorescentes)
 - o
 - 2) Cantidad de bacterias ingeridas comparando la fluorescencia media de las células fagocitadoras entre muestras.
- AVISO:** las bacterias se suministran en suspensión y la intensidad media de fluorescencia de las bacterias disminuye durante el almacenamiento. Las comparaciones entre la cantidad de bacterias ingeridas solo se pueden hacer si las muestras se analizaron el mismo día.

Valores previstos

Los valores medios de células fagocitadoras activas se determinaron examinando muestras de trece donantes de sangre sanos.

Subgrupo de leucocitos	Porcentaje de células fagocitadoras Media (+/- 2SD)
Granulocitos	91 (83-100)
Monocitos	82 (72-94)

Repetibilidad

La repetibilidad del ensayo se midió en trece muestras de sangre por cuadruplicado. Los coeficientes de variación (CV) figuran en la tabla siguiente.

	Intervalo medido (porcentaje de células fagocitadoras)	CV (%) (mín.-máx.)
Granulocitos	83-97	1,8 (0,1-4,9)
Monocitos	73-91	4,8 (1,0-15,8)

Referencias

- 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.

Uso de marcas comerciales de terceros

FlowJo™, FACSCanto™ son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company, VenturiOne® es una marca registrada de Applied Cytometry, Infinicyt™ es una marca registrada de Cytognos S.L..

Historial de revisiones

Versión 8, ED7040_TDS_v8

Cambio en la clasificación de peligros para el componente ED7040-3 Lysing Solution.

Fabricante

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic
Información de contacto
info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

AVISO: Cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto deberá notificarse al fabricante y a la autoridad local competente.