



IngoFlowEx[®] Kit

(100 tests / testů / testov)

Cat.no. / Kat. č.: ED7040

ENGLISH

1. Intended use

IngoFlowEx[®] Kit is intended for quantification of **phagocytic activity of human granulocytes and monocytes** by measuring the ingestion of fluorescently labeled *E. coli* bacteria in human heparinized whole blood using flow cytometry.

2. Introduction

The ability of phagocytosis is a characteristic feature of the so-called professional phagocytic cells (neutrophil and eosinophil granulocytes, monocytes and macrophages). The process includes the binding of foreign particles, e.g. bacteria, to cell surface receptors and the particle engulfment by the phagocytic cell. Differentiation of bound and internalized material is achieved by using trypan blue dye that suppresses the fluorescence of free and surface-bound bacteria. Opsonisation of bacteria, i.e. their coating with plasma proteins, opsonins (C3b, antibodies) facilitates the binding and engulfment. The bacteria used in the test were preopsonised by human AB plasma thus the results are not primarily dependent on the presence of opsonins in the tested blood sample.

3. Test principle

The test principle is based on measuring the intensity of the fluorescence of the phagocytes that engulfed FITC-labeled *E. coli*. A sample of heparinized blood is mixed with fluorescent *E. coli* and the mixture is incubated at 37 °C. For each reaction with *E. coli* a simultaneous control reaction without *E. coli* is performed that is used to assess the discrimination boundary between the phagocytosing and the non-phagocytosing cell population. Quenching solution is added at the end of the incubation period to suppress the fluorescence of non-engulfed bacteria. After washing the trypan blue away, the cells are fixed and RBCs lysed by adding a fixative-lysing reagent. After washing of the residues of erythrocytes the cellular DNA is labeled with propidium iodide. The labeling of cellular DNA helps to filter leukocytes out of debris and clumps of bacteria.

4. Precautions

- Intended for research use only.
- **Blood must be collected into a tube containing heparin.** Anticoagulants EDTA and citrate negatively affects results of the analysis.
- **Blood samples should be measured within 8 hours after collection.**

- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure the stable sensitivity of detectors.
- Do not use reagents after the expiration date stated on vial labels.
- Avoid contamination of reagents.
- Use protective gloves and follow procedures for handling potentially infectious materials.
- Avoid contact of samples with skin, eyes and mucous membranes.

Warning: 10xLysing Solution (ED7040-3) contains methanol, formaldehyde and 2,2' -oxybisethanol (diethylene glycol).

Harmful



R-phrases

- R 20/21/22 Harmful if inhaled, in contact with skin and if swallowed.
- R 36/37/38 Irritating to eyes, respiratory system and skin.
- R 40 Limited evidence of a carcinogenic effect.
- R 43 May cause sensitisation by skin contact.
- R 68/20/21/22 Harmful: possible risk of irreversible effects if inhaled, in contact with skin and if swallowed.

S-phrases

- S 24 Avoid contact with skin.
- S 36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.
- S 53 Avoid exposure – obtain special instructions before use.

5. Reagents provided

- ED7040-1 **E. coli-FITC** (ready to use) - amber glass vial containing 1 ml of a suspension of fluorescein-labeled opsonized *E. coli* strain K-12, vial is intended for 100 reactions.
- ED7040-2 **Quenching Solution** (ready to use) – vial containing 20 ml of buffered solution of trypan blue, dark blue solution, the vial is intended for 200 reactions.
- ED7040-3 **10xLysing Solution** (10x concentrated solution) - vial containing 60 ml of 10x concentrated transparent solution of fixative-lysing agent. Each vial is intended to prepare 600 ml of 1xLysing solution, i.e. 200 reactions.
- ED7040-4 **25xWash buffer** (25x concentrated solution) - vial containing 80 ml of concentrated wash buffer. Each vial is intended to prepare 2 liters of 1xWash buffer, i.e. 222 reactions.

- **ED7040-5 DNA Staining Solution** (ready to use) - amber vial containing 60 ml of pinkish solution of propidium iodide. Each vial is intended for 200 reactions.

6. Necessary material not supplied

- Deionized water (dH₂O), approximately 0.6 liter for one kit
- Phosphate buffered saline (PBS), approximately 2 liters
- Suitable 5ml test tubes for blood staining (e.g. 12 × 75 mm)
- Racks for the test tubes
- Centrifuge with suitable rotor for 5 ml tubes
- Automatic pipettes with disposable tips
- Vortex
- Thermal incubator or water bath (37 °C)
- Container with ice (ice cubes or crushed ice) suitable for placing a rack with tubes
- Flow cytometer - blue laser excitation 488 nm, light emission at 525 nm (FITC channel) and 617 nm (PE channel).
- Cylinders and glass bottles for the dilution of Wash buffer and Lysing solution

7. Storage

Store the IngoFlowEx® Kit at 2-8 °C. Expiration date is stated on reagent labels and on the IngoFlowEx® Kit box.

8. Assay procedure

8.1 Preparation of reagents before measurement

Wash buffer

Dilute 25xWash buffer with PBS to working concentration in a clean glass bottle. Allow the buffer to cool to 2-8 °C. Assign the 1xWash buffer with the date of preparation and store at 2-8 °C for up to 4 weeks. Use the information given in the table below as a quick guidance for dilution volumes.

No. of blood samples	Volume of 25xWash buffer in ml	Volume of PBS in ml	Total volume in ml
10	8	192	200
100	80	1920	2000

Lysing solution

Dilute 10xLysing solution with deionized water to working concentration in a clean glass bottle. Assign the 1xLysing solution with the date of preparation and store at 2-8 °C for up to 4 weeks. Use the information given in the table below as a quick guidance for dilution volumes.

No. of blood samples	Volume of 10xLysing solution in ml	Volume of dH ₂ O in ml	Total volume in ml
10	4	36	40
100	40	360	400

E. coli-FITC

Before use, thoroughly mix the contents of the vial using vortex.

8.2 Procedure

Cool down **1xWash buffer** to 2-8 °C.

Let the **1xLysing solution** reach the room temperature.

Place a rack for tubes into a container with ice.

Place the vials with **E. coli-FITC**, **Quenching solution** and **DNA Staining Solution** on ice.

Prepare **two tubes for each tested blood sample**:

- tube for the reaction with *E. coli* (E)
- tube for the control reaction without *E. coli* (C)

1. From each blood sample pipette 50 µl into the tube for reaction with *E. coli* (E) and 50 µl into the control tube reaction without *E. coli* (C).
2. Place the tubes on the ice and let them cool for 10 minutes.
3. Add 10 µl of the *E. coli* suspension into the tubes intended for reaction with *E. coli*, vortex and return the tubes to the ice.
4. Do not add anything into the control tubes.
5. Transfer all tubes (including the control tubes) into the thermal incubator set to 37 °C (or a water bath set to 37 °C).
6. Incubate for 30 minutes (shorten the incubation to 10 minutes if using the water bath)
7. Place the tubes back into the ice and let them cool down for 1-2 minutes.
8. Add 100 µl of precooled Quenching solution to all the tubes and mix well.
9. Add 3 ml of precooled 1xWash buffer and centrifuge the tubes for 5 min at 200×g at room temperature.
10. Remove the supernatant by aspiration into a container with an appropriate disinfectant; leave about 50 µl of residual volume.
11. Repeat wash (steps 9 and 10).
12. Resuspend the pellet in the residual volume of 1x Wash buffer.
13. Add 2 ml of 1xLysing solution (room temperature) and incubate for 20 minutes at room temperature in the dark.
14. Centrifuge for 5 min at 200×g at room temperature.
15. Remove the supernatant by aspiration into a container with appropriate disinfectant; leave about 50 µl of residual volume.
16. Wash the cells with 3 ml precooled 1xWash buffer and centrifuge for 5 min at 200×g at laboratory temperature.
17. Remove the supernatant by aspiration into a container with an appropriate disinfectant; leave about 50 µl of residual volume.
18. Resuspend in 300 µl DNA Staining Solution and incubate for 10 minutes on ice in the dark.
19. Measure with flow cytometer **within 2 hours** after adding the DNA Staining Solution.

9. Flow cytometric analysis

Setting up the cytometer before the first run: (Optional)

The color compensation for spectral overlap may be adjusted by using the assay procedure for a blood sample and fluorescent *E. coli* only (no quenching solution no DNA staining), a blood sample with Quenching solution only (no *E. coli* and no DNA staining) and a blood sample with DNA Staining Solution (no *E. coli* and no Quenching solution). Use the above mentioned measurements to adjust the cytometer settings.

Analysis of samples

Set up a gate in PE channel to acquire a sufficient number of cellular PE-bright events (10,000 events), the gate excludes debris and clumps of bacteria from further analysis (Figure 1). Visualize the events acquired in the side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) dot-plot and set gates around the granulocyte and monocyte subpopulations (Figure 2). Then bring the gated subpopulations to histograms in FITC channel. Use the control reaction histogram to place the discrimination line. The setting of the discrimination line is usually sufficient for all tested samples within the run. Calculate the percentage of positive events (phagocytic activity) (Figure 3A and 3B) and the median fluorescence intensity of positive events (phagocytic index).

10. Interpretation of results and the expected values

There are two basic evaluations: 1) the percentage of cells with engulfed *E. coli* (**phagocytic activity**) and 2) the median fluorescence intensity of cells that phagocytosed *E. coli*, which corresponds to the number of engulfed bacteria per cell (**phagocytic index**). The following table shows the average values of phagocytic activity that were calculated from data obtained by measurement of a set of blood samples from blood donors.

Subpopulation of cells	% phagocytosing cells (average +/- 2SD)
Granulocytes	91 (83-100)
Monocytes	82 (72-94)

11. Performance characteristics

Repeatability was determined by measuring four parallel reactions with a set of blood samples from blood donors and the phagocytic activity was assessed. The variability is expressed as the average coefficient of variation from these measurements.

	Range of the acquired values of phagocytic activity of tested samples (MIN-MAX)	Average CV (%)
% phagocytosing granulocytes	83.2-97.1	1.8
% phagocytosing monocytes	73.2-91.0	4.8

12. Limitations of the assay

- Reproducibility of the assay strongly depends on precise working (incubation times, temperature, pipetting).
- Flow cytometer may produce false results if the device has not been regularly calibrated and maintained appropriately.

1. Použití soupravy

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.

2. Úvod

Schopnost fagocytózy je charakteristická pro tzv. profesionální fagocytující buňky (neutrofilní a eozinofilní granulocyty, monocyty a makrofágy). Proces zahrnuje navázání cizorodých částic, např. bakterií, na povrchové receptory buněk a pohlcení částic fagocytující buňkou. Pro odlišení navázaných a pohlcených částic je použita v testu trypanová modř, která potlačuje fluorescenci volných a na povrch buněk navázaných bakterií. Oponizace bakterií, tzn. jejich obalení plazmatickými proteiny, opsoniny (C3b, protilátky) usnadňuje vazbu na receptory a pohlcení buňkou. Bakterie použité v testu byly pre-opsonizované lidskou AB plazmou, výsledek testu tak není primárně závislý na přítomnosti opsoninů ve vyšetřovaném vzorku krve.

3. Princip testu

Princip testu je založen na měření intenzity fluorescence fagocytů, které pohltily FITC označené bakterie *E. coli*. Vzorek plně heparinované krve se smíchá s fluorescenčními bakteriemi a směs se nechá inkubovat při 37 °C. Pro každou reakci s *E. coli* se paralelně provádí kontrolní reakce bez *E. coli*, která slouží k nastavení hranice mezi fagocytující a nefagocytující populací buněk. Na konci inkubační doby se přidává zhášecí činidlo k potlačení fluorescence nepohlcených bakterií. Po promytí od trypanové modři jsou buňky zafixovány a erythrocyty lyzovány přidáním fixačně-lyzačního činidla. Po promytí od zbytků erythrocytů se propidium iodidem naznačí DNA buněk, označení DNA napomáhá odlišení leukocytů od buněčného debrisu a shluků bakterií.

4. Upozornění

- Souprava je určena pouze pro výzkumné účely.
- **Krev musí být odebrána do zkumavky s heparinem.** Antikoagulanty EDTA a citrát ruší stanovení.
- **Vzorky krve zpracujte do 8 hodin po odběru.**
- Průtokový cytometr denně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nepoužívejte reagentie po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Pracujte výhradně v ochranných rukavicích a při práci dodržujte správné postupy pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem.
- Vyvarujte se kontaktu vzorků s pokožkou, očima a sliznicemi.

Varování: 10xLysing Solution (ED7040-3) obsahuje 2,2'-oxydiethan-1-ol (diethylenglykol), formaldehyd a metanol.

Zdraví škodlivý



R-věty

- R 20/21/22 Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití
 R 36/37/38 Dráždí oči, dýchací orgány a kůži
 R 40 Podezření na karcinogenní účinky
 R 43 Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží
 R 68/20/21/22 Zdravý škodlivý: možné nebezpečí nevratných účinků při vdechování, styku s kůží a při požití

S-věty

- S 24 Zamezte styku s kůží
 S 36/37 Používejte vhodný ochranný oděv a ochranné rukavice
 S 53 Zamezte expozici - před použitím si obstarejte speciální instrukce

5. Obsah soupravy

- **ED7040-1 E.coli-FITC** (připraveno k použití) – vialka z tmavého skla obsahující 1 ml suspenze opsonizovaných fluorescenčně značených bakterií *E. coli* K-12, vialka je určená pro 100 reakcí.
- **ED7040-2 Quenching Solution** (připraveno k použití) – lahvička obsahující 20 ml pufovaného roztoku Trypanové modři, tmavě modrý roztok, lahvička je určená pro 200 reakcí.
- **ED7040-3 10xLysing Solution** (10x koncentrovaný roztok) – lahvička obsahující 60 ml průhledného roztoku koncentrátu fixačního-lyzačního činidla. Jedna lahvička je určena pro přípravu 600 ml lyzačního činidla, tj. 200 reakcí.
- **ED7040-4 25xWash buffer** (25x koncentrovaný roztok) – lahvička obsahující 80 ml koncentrátu promývacího pufru. Jedna lahvička je určena pro přípravu 2 litrů promývacího roztoku, tj. 222 reakcí.
- **ED7040-5 DNA Staining Solution** (připraveno k použití) – tmavá neprůhledná lahvička obsahující 60 ml narůžovělého roztoku propidium iodidu. Jedna lahvička je určena pro 200 reakcí.

6. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

- Deionizovaná voda (dH₂O), přibližně 0,6 litru pro jeden kit
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS), přibližně 2 litry
- Vhodné 5 ml zkumavky pro inkubaci buněk (např. 12 × 75 mm).
- Stojánky pro zkumavky
- Centrifuga s rotorem pro 5 ml zkumavky
- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Inkubátor nebo vodní lázeň (37°C)
- Nádoba s ledem (ledové kostky nebo tříšť) vhodná pro umístění stojánku se zkumavkami
- Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC) a 617 nm (PE).
- Nádoby a odměrné válce pro naředění Wash buffer a Lysing solution na pracovní koncentrace

7. Skladování soupravy

IngoFlowEx® Kit skladujte při teplotě 2-8 C. Doba použitelnosti je vyznačena na jednotlivých reagentech a na obalu soupravy.

8. Postup testu

8.1 Příprava reagensí před měřením

Wash buffer

Naředte dostatečné množství 25xWash buffer do PBS na pracovní koncentraci do čisté skleněné lahve. Nechte roztok vychladit na 2-8 °C. Naředěný 1xWash buffer označte datem přípravy a skladujte při 2-8 °C po dobu maximálně 4 týdnů. Jako návod pro ředění můžete použít níže uvedenou ředící tabulku.

Počet vzorků krve	Objem 25xWash buffer v ml	Objem PBS v ml	Celkový objem v ml
10	8	192	200
100	80	1920	2000

Lysing solution

Naředte dostatečné množství 10xLysing solution deionizovanou vodou na pracovní koncentraci do čisté skleněné lahve. Naředěné 1xLysing solution označte datem přípravy a skladujte při 2-8 °C anebo při laboratorní teplotě po dobu maximálně 4 týdnů. Jako návod pro ředění můžete použít níže uvedenou ředící tabulku.

Počet vzorků krve	Objem 10xLysing solution v ml	Objem dH ₂ O v ml	Celkový objem v ml
10	4	36	40
100	40	360	400

E.coli-FITC

Před použitím důkladně promíchejte obsah vialky na vortexu.

8.2 Postup

Nechte vychladit **1xWash buffer** na 2-8 °C.

Vytempreujte **1xLysing solution** na laboratorní teplotu.

Připravte si nádobu s ledem a umístěte do ní stojánek na zkumavky.

Vialku s **E. coli-FITC**, lahvičky s **Quenching solution** a **DNA Staining Solution** umístěte na led.

Připravte si **pro každý vzorek krve dvě zkumavky**:

- zkumavku pro reakci s *E. coli* (E)
- zkumavku pro kontrolní reakci bez *E. coli* (K)

1. Z každého vzorku krve napipetujte 50 µl do zkumavky pro reakci s *E. coli* (E) a 50 µl do zkumavky pro reakci bez *E. coli* (K).
2. Umístěte zkumavky s krví na led a nechte 10 minut chladit.
3. Přidejte 10 µl suspenze *E. coli* do zkumavek určených pro reakce s *E. coli*, promíchejte na vortexu a vraťte zkumavky na led.
4. Do kontrolních zkumavek nic nepřidávejte.

5. Přeneste všechny zkumavky (i kontrolní) do inkubátoru nastaveného na 37 °C (nebo do vodní lázně nastavené na 37 °C).
6. Nechte inkubovat v inkubátoru 30 minut. (Ve vodní lázni zkrátte dobu na 10 minut.)
7. Umístěte zkumavky zpátky na led a nechte 2 minuty chladit.
8. Přidejte do všech zkumavek 100 µl vychlazeného Quenching solution, promíchejte obsah zkumavek na vortexu.
9. Přidejte 3 ml vychlazeného 1xWash buffer a centrifugujte zkumavky 5 minut 200×g při laboratorní teplotě.
10. Odsajte supernatant do nádoby s desinfekcí, ponechte cca 50 µl zbytkový objem pufru.
11. Opakujte promytí (krok 9 a 10).
12. Resuspendujte sediment ve zbytkovém objemu promývacího pufru.
13. Přidejte 2 ml 1xLysing solution vytemperovaného na laboratorní teplotu a nechte inkubovat 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
14. Centrifugujte zkumavky 5 min 200×g při laboratorní teplotě.
15. Odsajte supernatant do nádoby s desinfekcí, ponechte cca 50 µl zbytkový objem pufru.
16. Promyjte buňky 3 ml vychlazeného 1xWash buffer a centrifugujte zkumavky 5 min 200×g při laboratorní teplotě.
17. Odsajte supernatant do nádoby s desinfekcí, ponechte cca 50 µl zbytkový objem pufru.
18. Resuspendujte ve 300 µl DNA Staining Solution a nechte inkubovat 10 minut na ledu ve tmě.
19. Změřte vzorky na průtokovém cytometru do **2 hodin** od přidání DNA Staining Solution.

9. Analýza průtokovým cytometrem

Nastavení cytometru před prvním měřením:

(volitelné)

Kompenzaci spektrálního přesvitu můžete docílit provedením jednobarevných reakcí na vybraném vzorku krve: proveďte test 1) se vzorkem krve inkubovaným jenom s *E. coli* bez použití Quenching solution a bez DNA Staining Solution, 2) vzorkem krve „obarveném“ Quenching solution bez *E. coli* a DNA Staining Solution a 3) vzorkem krve s DNA Staining Solution bez *E. coli* a Quenching solution. Měření použijte k optimalizaci nastavení cytometru.

Měření vzorků

Nastavte ohraničení v kanálu pro PE a nechte nahrát dostatečný počet buněčných událostí silně svítících v PE (10.000 událostí), ohraničení odfiltruje debris a shluky bakterií z další analýzy (obrázek č. 1).

Naměřené buňky zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) a ohraničte subpopulace granulocytů a monocytů (obrázek č. 2).

Zobrazte ohraničené subpopulace v histogramech pro kanál FITC. Použijte kontrolní reakci pro umístění diskriminační linie. Jedno společné nastavení diskriminační linie je obvykle dostačující pro vyhodnocení všech právě vyšetřovaných vzorků. Spočítejte procentuální zastoupení pozitivních událostí

(**fagocytární aktivita**) (obrázek č. 3A a 3B) a jejich průměrnou intenzitou fluorescence (**fagocytární index**).

10. Vyhodnocení testu a očekávané hodnoty

Na vzorku lze hodnotit procentuální zastoupení buněk, které pohltily *E. coli* (**fagocytární aktivita**), a střední hodnotu fluorescence (median) buněk s fagocytovanými *E. coli*, která je přímo úměrná počtu fagocytovaných bakterií buňkou (**fagocytární index**). V tabulce dole jsou uvedeny průměrné hodnoty fagocytární aktivity, které byly vypočítané z dat naměřených na sadě vzorků krve od krevních dárců.

Populace buněk	% fagocytujících buněk (průměr +/- 2SD)
Granulocyty	91 (83-100)
Monocyty	82 (70-94)

11. Technické parametry testu

Opakovatelnost testu fagocytární aktivity byla stanovena změřením čtyř paralelních reakcí z jednoho vzorku krve postupně pro 13 vzorků od krevních dárců. Variabilita je vyjádřena průměrem koeficientů variability získaných z paralelních měření.

	Rozsah naměřených hodnot fagocytární aktivity testovaných vzorků (MIN-MAX)	Průměrný CV (%)
% fagocytujících granulocytů	83,2-97,1	1,8
% fagocytujících monocytů	73,2-91,0	4,8

12. Omezení metody

- Reprodukovatelnost měření je závislá na dodržování inkubačních časů, inkubační teploty a na preciznosti pipetování.
- Průtokový cytometr může poskytovat nesprávné hodnoty, pokud není pravidelně kalibrován a udržován.

1. Použitie súpravy

IngoFlowEx® Kit je určený na vyšetrenie **fagocytárnej aktivity granulocytov a monocytov** meraním ingescie fluorescenčne značených bakterií *E. coli* v plnej heparinizovanej ľudskej krvi pomocou prietokovej cytometrie.

2. Úvod

Schopnosť fagocytózy je charakteristická pre tzv. profesionálne fagocytujúce bunky (neutrofilné a eozinofilné granulocyty, monocyty a makrofágy). Proces zahŕňa naviazanie cudzorodých častíc, napr. baktérií, na povrchové bunkové receptory a pohltenie častice bunkou. Pre odlišenie naviazaných a pohltených častíc je v teste použitá trypanová modrá, ktorá potláča fluorescenciu voľných a na povrchu viazaných baktérií. Oponizácia baktérií, tzn. ich obalenie plazmatickými proteínmi, opsonínmi (C3b, protilátky) uľahčuje väzbu na receptory a pohltenie bunkou. Baktérie použité v teste boli predopsonizované ľudskou AB plazmou, výsledok testu takto nie je primárne závislý na prítomnosti opsonínov vo vyšetrovanej vzorke krvi.

3. Princíp testu

Princíp testu je založený na meraní intenzity fluorescence fagocytov, ktoré pohltili baktérie *E. coli* značené FITC. Vzorka plnej heparinizovanej krvi sa zmieša s fluorescenčnými baktériami a zmes sa nechá inkubovať pri teplote 37 °C. Pre každú reakciu s *E. coli* je paralelne pripravovaná kontrolná reakcia bez *E. coli*, ktorá slúži na nastavenie hranice medzi fagocytujúcimi a nefagocytujúcimi populáciami buniek. Na konci inkubačnej doby sa pridáva trypanová modrá k potlačeniu fluorescence nepohltených baktérií. Po premytí od trypanovej modrej sú bunky zafixované a erytrocyty lyzované pridaním fixačného-lyzačného činidla. Po premytí od zvyškov erytrocytov sa propidium iodidom označí DNA buniek, značenie DNA napomáha odlišeniu leukocytov od bunkového debris a zhlukov baktérií.

4. Upozornenie

- Súprava je určená len na výskumné účely.
- **Krv musí byť odobratá do skúmavky s heparínom.** Antikoagulanty EDTA a citrát narúšajú stanovenie.
- **Vzorky krvi spracujte do 8 hodín po odbere.**
- Prietokový cytometer denne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľčiek, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.
- Nepoužívajte reagenty po uplynutí času použiteľnosti.
- Chráňte obsah fľaštičiek pred kontamináciou.
- Pracujte výhradne v ochranných rukaviciach a pri práci dodržujte správne postupy zaobchádzania s potenciálne infekčným materiálom.
- Vyvarujte sa kontaktu vzoriek s pokožkou, očami a sliznicami.

Varovanie: 10xLysing Solution (ED7040-3) obsahuje 2,2'-oxydiethan-1-ol (diethylen glykol), formaldehyd a methanol.

Zdraviu škodlivé



R-vety

- R 20/21/22 Škodlivý pri vdýchnutí, pri kontakte s pokožkou a po požití
- R 36/37/38 Dráždi oči, dýchacie cesty a pokožku
- R 40 Podozrenie na karcinogénne účinky
- R 43 Môže spôsobiť senzibilizáciu pri kontakte s pokožkou
- R 68/20/21/22 Škodlivý, možné riziko ireverzibilných účinkov vdýchnutím, pri kontakte s pokožkou a po požití

S-vety

- S 24 Zabráňte kontaktu s pokožkou
- S 36/37 Noste vhodný ochranný odev a ochranné rukavice
- S 53 Zabráňte expozícii - pred použitím sa oboznámte so špeciálnymi inštrukciami.

5. Obsah súpravy

- ED7040-1 E.coli-FITC (pripravené na použitie) - fľaštička z tmavého skla obsahujúca 1 ml suspenzie opsonizovaných fluorescenčne označených baktérií *E. coli* K-12, fľaštička je určená pre 100 reakcií.
- ED7040-2 Quenching Solution (pripravené na použitie) - fľaštička obsahujúca 20 ml pufovaného roztoku trypanovej modrej, tmavo modrý roztok, fľaštička je určená pre 200 reakcií.
- ED7040-3 10xLysing Solution (10x koncentrovaný roztok) - fľaštička obsahujúca 60 ml priehľadného roztoku koncentráту fixačného-lyzačného činidla. Jedna fľaštička je určená pre prípravu 600 ml lyzačného činidla, tj 200 reakcií.
- ED7040-4 25xWash buffer (25x koncentrovaný roztok) - fľaštička obsahujúca 80 ml koncentráту premývacieho roztoku. Jedna fľaštička je určená pre prípravu 2 litrov premývacieho roztoku, tj 222 reakcií.
- ED7040-5 DNA Staining Solution (pripravené na použitie) - tmavá nepriehľadná fľaša obsahujúca 60 ml svetlo ružového roztoku propidium iodidu. Jedna fľaštička je určená pre 200 reakcií.

6. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý nie je dodávaný

- Deionizovaná voda (dH₂O), približne 2,5 litra pre jeden kit.
- Fosfátom pufovaný fyziologický roztok (PBS), približne 2 litre
- Vhodné 5 ml skúmavky pre inkubáciu buniek (napr. 12 × 75 mm).
- Stojančeky na skúmavky
- Centrifúga s rotorom pre 5 ml skúmavky
- Sada automatických pipiet s jednorazovými špičkami
- Vortex
- Inkubátor alebo vodný kúpeľ (37 °C)
- Nádoba s ľadom (ľadové kocky alebo triešť) vhodná pre umiestnenie stojančeku so skúmavkami

- Prietokový cytometer - excitácia modrým laserom 488 nm, emisia žiarenia pri 525 nm (FITC) a 617 nm (PE).
- Nádoby a odmerné valce pre nariadení Wash buffer a Lysing solution na pracovnú koncentráciu

7. Skladovanie súpravy

IngoFlowEx ® Kit skladujte pri teplote 2-8 °C. Doba použiteľnosti je vyznačená na jednotlivých reagenciách a na obale súpravy.

8. Postup testu

8.1 Príprava reagensí pred meraním

Wash buffer

Nariedte dostatočné množstvo 25xWash buffer do PBS na pracovnú koncentráciu do čistej sklenenej fľaše. Nechajte roztok vychladiť na 2-8 °C. Nariedený 1xWash buffer označte dátumom prípravy a skladujte pri 2-8 °C po dobu maximálne 4 týždňov. Ako návod pre riedenie môžete použiť nižšie uvedenú riediacu tabuľku.

Počet vzorkov krve	Objem 25xWash buffer v ml	Objem PBS v ml	Celkový objem v ml
10	8	192	200
100	80	1920	2000

Lysing solution

Nariedte dostatočné množstvo 10xLysing solution deionizovanou vodou na pracovnú koncentráciu do čistej sklenenej fľaše. Nariedené 1xLysing solution označte dátumom prípravy a skladujte pri 2-8 °C alebo pri laboratórnej teplote po dobu maximálne 4 týždňov. Ako návod pre riedenie môžete použiť nižšie uvedenú riediacu tabuľku.

Počet vzorkov krve	Objem 10xLysing solution v ml	Objem dH ₂ O v ml	Celkový objem v ml
10	4	36	40
100	40	360	400

E.coli-FITC

Pred použitím dôkladne premiešajte obsah fľaštičky na vortexe.

8.2 Postup

Nechajte vychladiť 1xWash buffer na 2-8 °C.

Vytempreujte 1xLysing solution na laboratórnu teplotu. Pripravte si nádobu s ľadom a umiestnite do nej stojan na skúmavky.

Fľaštičku s **E. coli-FITC**, fľaštičky s **Quenching solution** a **DNA Staining Solution** umiestnite na ľad.

Pripravte si **pre každú vzorku krvi dve skúmavky**:

- skúmavku pre reakciu s *E. coli* (E)
 - skúmavku pre kontrolnú reakciu bez *E. coli* (K)
1. Z každej vzorky krvi napipetujte 50 µl do skúmavky pre reakciu s *E. coli* (E) a 50 µl do skúmavky pre reakciu bez *E. coli* (K).
 2. Umiestnite skúmavky s krvou na ľad a nechajte 10 minút chladiť.
 3. Pridajte 10 µl suspenzie *E. coli* do skúmaviek určených pre reakcie s *E. coli*, premiešajte na vortexe a vráťte skúmavku na ľad.
 4. Do kontrolných skúmaviek nič nepipetujte.
 5. Preneste všetky skúmavky (i kontrolné) do inkubátora nastaveného na 37 °C (alebo do vodného kúpeľa nastaveného na 37 °C).
 6. Inkubujte v inkubátore 30 minút. (Vo vodnom kúpeli skráťte dobu na 10 minút.)
 7. Umiestnite skúmavky späť na ľad a nechajte 2 minúty chladiť.
 8. Do všetkých skúmaviek pridajte 100 µl vychladeného Quenching solution, premiešajte obsah skúmaviek na vortexe.
 9. Pridajte 3 ml vychladeného 1xWash buffer a centrifugujte skúmavky 5 min 200×g pri laboratórnej teplote.
 10. Odsajte supernatant do nádoby s dezinfekciou, ponechajte cca 50 µl zvyškový objem pufru.
 11. Opakujte premytie (krok 9 a 10).
 12. Resuspendujte sediment vo zostatkovom objeme premývacieho pufru.
 13. Pridajte 2 ml 1xLysing solution vytemperovaného na laboratórnu teplotu a inkubujte 20 minút v tme pri laboratórnej teplote.
 14. Centrifugujte 5 min 200×g pri laboratórnej teplote.
 15. Odsajte supernatant do nádoby s dezinfekciou, ponechajte cca 50 µl zvyškový objem pufru.
 16. Premyjte bunky 3 ml vychladeného 1xWash buffer a centrifugujte 5 min 200×g pri laboratórnej teplote.
 17. Odsajte supernatant do nádoby s dezinfekciou, ponechajte cca 50 µl zvyškový objem pufru.
 18. Resuspendujte v 300 µl DNA Staining Solution a inkubujte 10 minút na ľade v tme.
 19. Zmerajte vzorky na prietokovom cytometri do **2 hodín** od pridania DNA Staining Solution.

9. Analýza prietokovým cytometrom

Nastavenie cytometru pred prvým meraním:
(voliteľné)

Kompenzáciu spektrálneho presvitu môžete docieľiť analýzou jednofarebných reakcií na vybranej vzorke krvi: vykonajte test 1) so vzorkou krvi inkubovanou iba s *E. coli* bez použitia Quenching solution a bez DNA Staining Solution, 2) so vzorkou krvi "ofarbenou" Quenching solution bez *E. coli* a DNA Staining Solution a 3) vzorkou krvi s DNA Staining Solution bez *E. coli* a Quenching solution. Meranie použite na optimalizáciu nastavenia cytometra.

Meranie vzoriek

Nastavte ohraničenie v kanáli pre PE a nechajte nahrat dostatočný počet bunkových udalostí silno svietiacich v PE (10.000 udalostí), ohraničenie vylúči debris a zhluky baktérií z ďalšej analýzy (obrázok č 1).

Namerané bunky zobrazte v grafe side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) a orámujte supopulácie granulocytov a monocytov (obrázok č 2).

Zobrazte ohraničené subpopulácie v histograme pre kanál FITC. Použite kontrolnú reakciu pre umiestnenie diskriminačnej línie. Jedno spoločné nastavenie diskriminačnej línie je obvyčajne postačujúce pre vyhodnotenie všetkých práve vyšetovaných vzoriek. Spočítajte percentuálne zastúpenie pozitívnych udalostí (**fagocytárna aktivita**) (obrázok č. 3A a 3B) a ich strednú intenzitu fluorescencie (**fagocytárny index**).

10. Vyhodnotenie testu a očakávané hodnoty

Na vzorke možno hodnotiť percentuálne zastúpenie buniek s fagocytovanými *E. coli* (**fagocytárna aktivita**) a strednú hodnotu fluorescencie (median) buniek s fagocytovanými *E. coli*, ktorá je priamo úmerná počtu baktérií na bunku (**fagocytárny index**). Nižšie v tabuľke sú uvedené priemerné hodnoty fagocytárnej aktivity, ktoré boli vypočítané z dát nameraných na sade vzoriek krvi od darcov krvi.

Populácia buniek	% fagocytujúcich buniek (průměr +/- 2SD)
Granulocyty	91 (83-100)
Monocyty	82 (70-94)

11. Parametry testu

Opakovateľnosť stanovenia fagocytárnej aktivity bola stanovená zmeraním štyroch paralelných reakcií u sady vzoriek od krvných darcov. Variabilita je vyjadrená priemerom koeficientov variability z uvedených meraní.

	Rozsah nameraných hodnôt fagocytárnej aktivity testovaných vzoriek (MIN-MAX)	Priemerný CV (%)
% fagocytujúcich granulocytov	83,2-97,1	1,8
% fagocytujúcich monocytov	73,2-91,0	4,8

12. Obmedzenia metódy

- Reprodukovateľnosť merania je závislá na dodržiavaní inkubačných časov, inkubačnej teploty a na precízności pipetovania.
- Prietokový cytometer môže poskytovať nesprávne hodnoty, ak nie je pravidelne kalibrovaný a udržiavaný.

13. Example of data / Vzorové vyhodnocení /
Vzorové vyhodnotenie

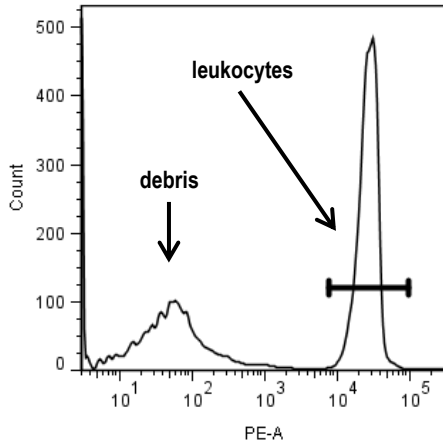


Fig. 1 Gate for cells that exclude debris and bacterial clumps from further analysis.
Obr. 1 Ohraničení buněk k odstranění debris a shluků bakterií.
Obr. 1 Ohraničenie buniek k odfiltrovaníu debris a zhlukov baktérií.

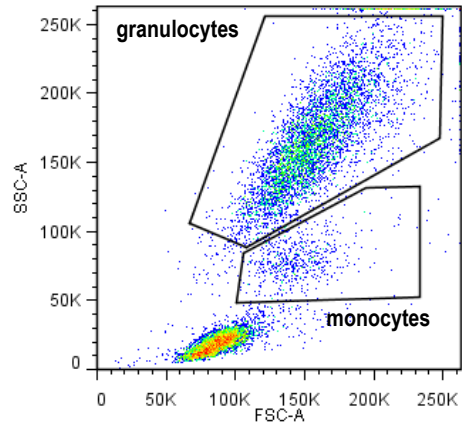


Fig. 2 Gates for granulocytes and monocytes.
Obr. 2 Ohraničení subpopulací granulocytů a monocytů.
Obr. 2 Ohraničenie granulocytov a monocytov.

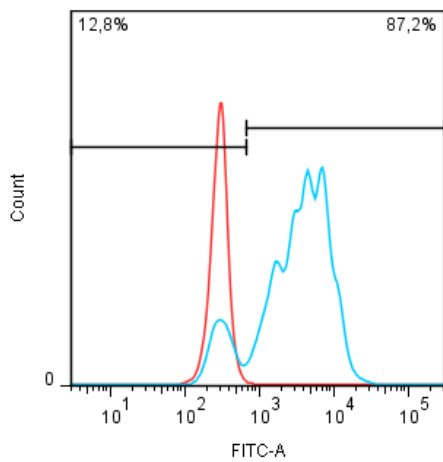


Fig. 3A Overlay of histograms of granulocyte subpopulation.
Obr. 3A Histogramy granulocytů přeložené přes sebe.
Obr. 3A Histogramy granulocytov preložené cez seba.

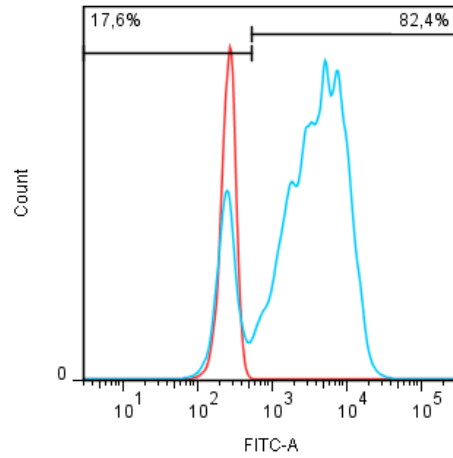


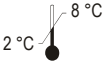




Fig. 3B Overlay of histograms of monocyte subpopulation
Obr. 3B Histogramy monocyte přeložené přes sebe.
Obr. 3B Histogramy monocytov preložené cez seba

14. References / Literatura/ Literatúra

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.

15. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

 REF	Catalog number Katalogové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
 2 °C — 8 °C	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplot Rozmedzie skladovacích teplôt
 LOT	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do

16. Manufacturer / Výrobce / Výrobca

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
<http://www.exbio.cz>