

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «МедИнформ»



Проценко Р.М.

ИНСТРУКЦИЯ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ

Наборы реагентов in vitro для проточной цитометрии,
производства
Гликотоп Биотехнолоджи ГмбХ, Германия

2012 г.

Содержание

- | | | |
|---|---|-------|
| 1. Набор реагентов in vitro для проточной цитометрии Бурсттест (Bursttest)* | – | 3-13 |
| 2. Набор реагентов in vitro для проточной цитометрии Мигратест (Migratest) | – | 14-22 |
| 3. Набор реагентов in vitro для проточной цитометрии Фаготест (Phagotest) | – | 23-33 |

* Bursttest, ранее – Phagoburst.

PHAGOBURST™

Набор реагентов для количественного определения активности окислительного взрыва моноцитов и гранулоцитов в гепаринизированной цельной крови человека

Набор реагентов содержит флуорогенный субстрат, стимуляторы и реагенты для проведения 100 тестов



Glycotope Biotechnology GmbH
Czernyring 22
69115 Heidelberg
Германия
Тел. +49 (0)62 21 91 05-0
Факс +49 (0)62 21 91 05-10
Эл. почта: info@glycotope-bt.com
www.glycotope-bt.com

Условные обозначения

	Медицинское устройство для диагностики <i>in vitro</i>		Включает реагенты для <n> тестов
	Декларация соответствия ЕС		Ограничение температур
	Место производства		Обратитесь к инструкциям по применению
	Номер по каталогу		Использовать до
	Номер партии		Реагент*
	Содержит		

* Подробное разъяснение символов, используемых в наименованиях компонентов реагентов, см. в главе «Материалы и реагенты».

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ И ОПИСАНИЕ

Данный набор позволяет проводить количественное определение окислительного взрыва в лейкоцитах гепаринизированной цельной крови. Он содержит немеченные опсонизированные бактерии (*E.coli*), форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) и пептид хемотаксиса N-формил-метионин-лейцин-фенилаланин (fMLP) в качестве стимуляторов, дигидрорадамин 123 (DHR) в качестве флуорогенной подложки и необходимые реагенты. Тест определяет процентное соотношение фагоцитов, вырабатывающих реактивные окислители (преобразование дигидрорадамина 123 в родамин 123) и их ферментативную активность (количество родамина 123 на клетку).

Оценка активности окислительного взрыва выполняется при помощи проточной цитометрии. При проведении количественного анализа крайне необходима точность работы, особенно, когда требуется ежедневное сравнение результатов. Более подробные указания – результат специфического опыта и точных анализов проверки. Наиболее важные этапы выделены жирным шрифтом. Также прилагается графический отчет теста.

ПРИМЕНЕНИЕ

PHAGOBURST™ предназначен для исследования измененной активности окислительного взрыва, связанной с различными нарушениями, и для оценки действия лекарственных препаратов.

Снижение либо отсутствие активности взрыва наблюдается при врожденных нарушениях, например при хроническом гранулематозе (CGD). Хронический гранулематоз относится к гетерогенной группе наследственных заболеваний, которые обычно проявляются в течение первых двух лет жизни (3, 4). Клинически заболевание характеризуется повторяющимися опасными для жизни инфекциями, вызванными бактериальными и грибковыми организмами. Эти инфекции обычно вызывают пневмонию, лимфаденит, абсцесс лимфатических узлов, легких и печени. НАДФН-оксидазы являются ферментной системой, ответственной за выработку супероксид аниона, который быстро превращается в перекись водорода и гидроксильные радикалы. Отклонения в структуре пептидов, являющихся компонентами ферментной системы НАДФН-оксидазы,

приводят к дисфункциям, характерным для хронического гранулематоза. Нейтрофилы пациентов с хроническим гранулематозом не производят значительного окислительного взрыва после стимуляции. Описаны различные формы хронического гранулематоза (классический сцепленный с X-хромосомой хронический гранулематоз и аутосомно-рецессивные виды). PHAGOBURST™ – быстрый и чувствительный метод диагностики хронического гранулематоза и обнаружения носителей X-сцепленного дефекта.

Снижение активности окислительного взрыва было обнаружено у больных СПИДом (5), у пожилых людей (6), у пациентов с тяжелыми инфекциями (7), у пациентов, проходивших лечение N-ацетилцистеином (8) или у реципиентов костного мозга и трансплантатов крови (9).

У новорожденных без лабораторных признаков инфекции было обнаружено увеличение спонтанных и вызванных fMLP респираторных взрывов нейтрофилов (10).

Считается, что различные иммуномодуляторы (например, цитокины (ГМКСФ, ГКСФ, ФНО α) и лекарственные препараты), оказывают влияние на окислительный взрыв. При использовании fMLP в качестве слабого стимулятора можно исследовать аддитивные или иницирующие эффекты (11) тестируемых веществ.

Тестовый набор совместим с кровью мышей, крыс, кроликов, собак, крупного рогатого скота и кровью других видов (12–14).

ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

Фагоцитоз полиморфноядерных нейтрофилов и моноцитов является важным средством защиты организма от бактериальных и грибковых инфекций. Процесс фагоцитоза можно разделить на несколько основных этапов: хемотаксис (миграция фагоцитов к очагам воспаления), прикрепление частиц к поверхности клетки фагоцитов, поглощение (фагоцитоз) и внутриклеточное уничтожение при помощи кислород-зависимых (окислительный взрыв) и кислород-независимых механизмов (1, 2).

PHAGOBURST™ позволяет проводить количественное определение окислительного взрыва в лейкоцитах. Комплект PHAGOBURST™ содержит немеченные опсонизированные бактерии (*E.coli*) (реагент В) в качестве

крупнодисперсного стимулятора, лиганд протеинкиназы С форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА, реагент D) в качестве сильного стимулятора и пептид хемотаксиса N-формил-метионин-лейцин-фенилаланин (fMLP, реагент C) в качестве слабого физиологического стимулятора, дигидрородамин 123 (DHR) (реагент E) в качестве флюорогенной подложки, а также все необходимые реагенты. Гепаринизированная цельная кровь инкубируется с различными стимуляторами при 37°C, образец без стимулирования используется в качестве контрольного. При стимуляции гранулоциты и моноциты вырабатывают реактивные метаболиты кислорода (супероксид-анион, перекись водорода, хлорноватистую кислоту), которые уничтожают бактерии внутри фагосомы. Формирование реактивных окислителей во время окислительного взрыва можно отследить с помощью увеличения и окисления дигидрородамина 123. Реакцию останавливают, добавляя лизирующий раствор (реагент F), удаляющий эритроциты, что приводит к частичному связыванию лейкоцитов. После одной отмывки с помощью отмывающего раствора (реагент A), добавляют раствор для окраски ДНК (реагент G) для исключения артефактов агрегации бактерий или клеток. Затем анализируют процентное соотношение клеток, выработавших реактивные радикалы кислорода, а также их среднюю интенсивность флуоресценции (ферментативную активность).

Таким образом, фагоцитоз и последующее расщепление – многоступенчатый и многофакторный процесс (1, 2). Поэтому для его исследования в контролируемых условиях применяются разные наборы: MIGRATEST™ – для измерения хемотаксиса, PHAGOTEST™ – для измерения поглощения микробов, PHAGOBURST™ – для измерения окислительного взрыва.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Набор реагентов содержит:

Реагент A

1 флакон выпаренной соли в смеси с 1 л бидистиллированной воды, дает 1 л готового к использованию 1 х отмывающего раствора.

Реагент B

1 флакон (2 мл) взвеси стабилизированных и опсонизированных (немеченых) E.coli, 1 х раствор, готовый к использованию, прил. 1-2 x 10⁹ бактерий в 1 мл.

Реагент C

1 флакон (100 мкл), содержащий пептид хемотаксиса (fMLP) (200 х исходный раствор, 1 ммоль). Разводится в соотношении 5 мкл на 1 мл отмывающего раствора.

Реагент D

1 флакон (100 мкл), содержащий форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) (200 х исходный раствор, 1,62 ммоль). Разводится в соотношении 5 мкл на 1 мл отмывающего раствора.

Реагент E

12 флаконов, каждый из которых содержит один диск субстрата, содержащий дигидрородамин 123, который разводится с помощью инъекции 1 мл отмывающего раствора за 20–30 мин перед использованием в 1 мл раствора субстрата.

Реагент F

1 флакон (20 мл) лизирующего раствора (10 х исходный раствор для хранения), для приготовления 200 мл 1 х раствора после разведения в пропорции 1 : 10 бидистиллированной водой для лизирования эритроцитов и одновременного связывания лейкоцитов.

Реагент G

1 флакон (20 мл) раствора для окраски ДНК для цитометрического различия бактерий во время анализа лейкоцитов, розовый раствор реагента, 1 х раствор.

Набор реагентов не содержит следующие материалы, необходимые для анализа:

1. Пробирки для сбора крови, содержащие антикоагулянт гепарин.
2. Одноразовые пробирки размером 12 x 75 мм (Falcon, Becton Dickinson № 352052) и соответствующие стойки.
3. Колбы (500 мл и 1000 мл) для отмывающего раствора (реагента A) и 1 х лизирующего раствора (реагента D).
4. Емкость со льдом и с крышкой.
5. Бидистиллированная вода или вода для инъекций для приготовления отмывающего раствора (реагента A), а также для разбавления 10 х лизирующего раствора (реагента D).

Необходимая аппаратура:

1. Микропипетки с изменяющимся объемом 20–200 мкл, 100–1000 мкл и одноразовые наконечники.
2. Диспенсеры и наконечники для диспенсеров.
3. Диспенсеры на бутылки для отмывающего и лизирующего раствора.
4. Водяная баня.
5. Цифровой термометр.
6. Вихревой смеситель.
7. Охлаждающая центрифуга с качающимся ротором и вкладышами для пробирок размером 12 x 75 мм.
8. Проточный цитометр с длиной волны возбуждения 488 нм (аргоновый лазер).

ВНИМАНИЕ

1. Образцы крови должны всегда рассматриваться как потенциально инфицированные. Используйте одноразовые перчатки и защитную одежду при работе с образцами крови.
2. Реагент А содержит хлорацетамид и натриевую соль и этилендиаминтетрауксусной кислоты. Хлорацетамид вреден при вдыхании и попадании на кожу (R22) и может вызвать раздражение на коже (R43). Возможен риск нарушения фертильности (R62). Не вдыхайте пыль (S22). Используйте соответствующую защитную одежду, перчатки и защиту глаз/лица (S36/37/39). Натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты вызывает раздражение глаз (R36) и может вызывать длительные неблагоприятные эффекты в водной среде (R52/53). Не допускайте попадания в окружающую среду. См. специальные инструкции / инструкции по технике безопасности (S61).
3. Реагенты С и D содержат диметилсульфоксид. Диметилсульфоксид вызывает раздражение глаз, дыхательных путей и кожи (R36/37/38). Избегайте контакта с кожей и глазами (S24/25). В случае попадания в глаза, немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26).
4. Реагент D содержит форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА). ФМА очень токсичен при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании (R26/27/28). Он вызывает раздражение глаз, дыхательных путей и кожи (R36/37/38). Возможен риск необратимых последствий (R40). При несчастном случае или при

- возникновении недомогания, немедленно обратитесь за медицинской помощью (S45), в случае попадания в глаза, немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26). Немедленно снимите всю загрязненную одежду (S27). Используйте соответствующую защитную одежду, перчатки и защиту глаз/лица (S36/37/39).
5. Реагент F содержит диэтиленгликоль и формальдегид. Формальдегид вреден при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании (R20/21/22). Он вызывает раздражение глаз, дыхательных путей и кожи (R36/37/38). Возможен риск необратимых последствий (R40). Может вызывать раздражение кожи при контакте (R43). В случае попадания в глаза, немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26). Используйте соответствующую защитную одежду и перчатки (S36/37). При несчастном случае или при возникновении недомогания, немедленно обратитесь за медицинской помощью (S45). Используйте только в хорошо проветриваемых помещениях (S51). Диэтиленгликоль вреден при проглатывании (R22). При проглатывании немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите эту упаковку или этикетку (S46).
 6. Краситель ДНК загрязняет пипетки и систему доставки образца проточного цитометра и, возможно, влияет на анализ иммунофлюоресценции, особенно в случае антител, помеченных фикоэритрином. Разбавленный гипохлорит натрия (0,5–1,5%) устраняет загрязнения от красителя ДНК.

ХРАНЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Набор следует хранить в темноте при температуре 2–8°C (в холодильнике). Перед использованием тщательно перемешайте бактерии (вихревым смесителем) или при помощи шприца с узкой иглой. После использования рабочие растворы fMLP и ФМА следует утилизировать. Реагенты поставляются с консервантом, который не влияет на активность окислительного взрыва. Реагенты стабильны в течение периода, указанного на этикетке упаковки, и при соответствующем хранении.

ПРОЦЕДУРА

1. Приготовление:

- 1.1 Растворите соли для отмывающего раствора (реагент А) в 1 л бидистиллированной воды для приготовления отмывающего раствора.
- 1.2 Разбавьте исходные растворы реагента С (исходный раствор fMLP) и реагента D (исходный раствор ФМА) в пропорции 1 : 200 с отмывающим раствором (объем по мере необходимости, например, 5 мкл в 1 мл, из расчета 20 мкл на один образец крови).
- 1.3 Разбавьте исходный раствор реагента F в пропорции 1 : 10 в бидистиллированной воде (объем по мере необходимости, 2 мл на тест).
- 1.4 Подготовьте раствор субстрата: в день анализа разведите реагент Е путем введения 1 мл отмывающего раствора 1 мл шприцом, **оставьте его на 20–30 минут** перед использованием и осторожно взболтайте (**не используйте вихревой смеситель!**). Неиспользованный раствор субстрата можно хранить замороженным при температуре ниже -15°C до двух недель.
- 1.5 Подготовьте емкость со льдом.
- 1.6 Прогрейте водяную баню до температуры 37°C (**необходим точный контроль температуры!**).
- 1.7 Включите и откалибруйте проточный цитометр.

2. Установки окислительного взрыва:

2.1 Дозирование:

Гепаринизированная цельная кровь осторожно перемешивается (вихревым смесителем) и аликвотируется на дне 5 мл пробирки, **100 мкл на тест**. Кровь не должна оставаться на боковых стенках пробирки, как и при анализе иммунофлюоресценции. **НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ** кровь, в которую в качестве антикоагулянта добавлена EDTA или лимонная кислота! Перед добавлением бактерий образцы крови следует инкубировать в емкости со льдом в течение 10 минут, чтобы охладить их до 0°C.

2.2 Активация:

- (1) Добавьте **20 мкл отмывающего раствора (реагент А)** в пробирку в качестве «отрицательного контроля» (пробирка № 1).
 - (2) Хорошо перемешайте предварительно охлажденные бактерии **E.coli (реагент В)** и добавьте в цельную кровь из расчета **20 мкл на тест** (пробирка № 2).
 - (3) Добавьте **20 мкл рабочего раствора fMLP (реагент С)** в другую пробирку в качестве «низкого контроля» (пробирка № 3).
 - (4) Добавьте **20 мкл рабочего раствора ФМА (реагент D)** в другую пробирку в качестве «высокого контроля» (пробирка № 4).
- Перемешайте все пробирки еще раз. Инкубируйте анализируемые на взрыв образцы в течение **10 мин при 37,0°C** на водяной бане. Водяная баня должна быть закрыта и предварительно прогрета. Тщательно контролируйте время и температуру инкубации.

2.3 Окисление:

После 10 мин инкубации добавьте **20 мкл раствора субстрата (реагент Е)** и тщательно перемешайте образец вихревым смесителем. Все пробирки инкубируйте в течение еще **10 минут при температуре 37,0°C** на водяной бане.

2.4 Лизис и фиксация:

Образцы цельной крови лизируются и фиксируются **2 мл** предварительно нагретого до комнатной температуры **1 х реагента F (лизирующего раствора)**.

Смешайте образцы вихревым смесителем и инкубируйте в течение **20 минут при комнатной температуре**. Отцентрифугируйте клетки (5 мин, при 250 g, при 2–8°C). Удалите надосадочную жидкость.

2.5 Промывка:

Добавьте в пробирки **3 мл отмывающего раствора (реагент А)**. Отцентрифугируйте пробирки (5 мин, при 250 g, при 2–8°C). Аспирируйте надосадочную жидкость.

2.6 Окрашивание ДНК:

Добавьте в пробирки 200 мкл раствора для окрашивания ДНК (реагент G). Смешайте и инкубируйте 10 минут на льду (в емкости со льдом без доступа света).

Проведите измерения в клеточной взвеси в течение последующих 30 минут.

3. Анализ методом проточной цитометрии

Клетки анализируются методом проточной цитометрии с использованием сине-зеленого излучения (488 нм аргонный лазер).

Измерения:

Во время сбора данных «живой» гейт устанавливается на гистограмме красной флуоресценции на тех событиях, которые содержат, по крайней мере, такое же количество ДНК, что и диплоидные клетки человека (т.е. исключение скопления бактерий, имеющих те же свойства рассеивания света, что и лейкоциты. См. рис. 1А). Кроме того, бактерии могут быть исключены из анализа путем установления порога флуоресценции по FL2 и FL3 каналу.

Соберите 10 000–15 000 лейкоцитов на образец.

Оценка данных:

Анализируется процентное соотношение клеток, которые выработали реактивные метаболиты кислорода (набор), а также их средняя интенсивность флуоресценции (количество расщепленного субстрата, активность). Для этой цели соответствующий кластер лейкоцитов гейтируется программным обеспечением по гистограмме светорассеяния (lin FSC и lin SSC) и затем анализируется гистограмма зеленой флуоресценции (FL1) (см. рис. 2А–2F).

Для этого используйте контрольный образец для установления маркера флуоресценции-1 (FL1) таким образом, чтобы менее 1–3% событий были позитивными. Процент положительных клеток в тестовых образцах может быть определен путем подсчета числа событий над этой позицией маркера. Среднее значение флуоресценции коррелирует с количественной оценкой окисления на один лейкоцит.

РИСУНКИ

Рекомендуемая гистограмма / дот плот (точечный график), отображаемые во время сбора данных (см. рис. 1А, 1В, 1С).

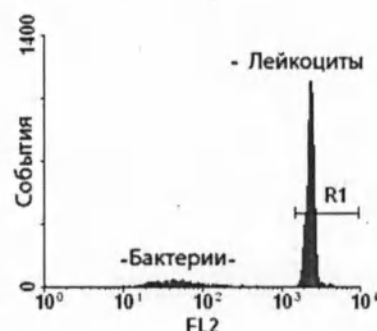


Рис. 1А Живой гейт на ДНК лейкоцитов (гистограмма FL2)

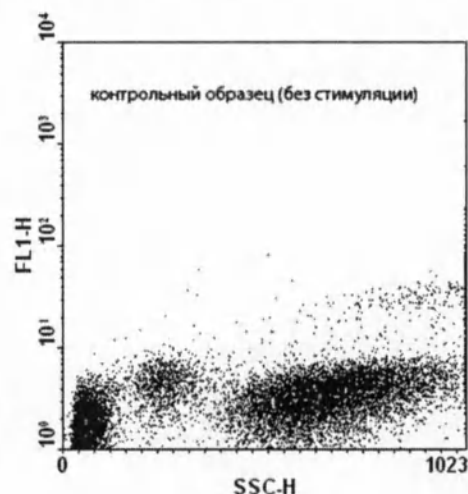


Рис. 1В Дот плот lin SSC / log FL1 контрольного образца (без стимуляции)

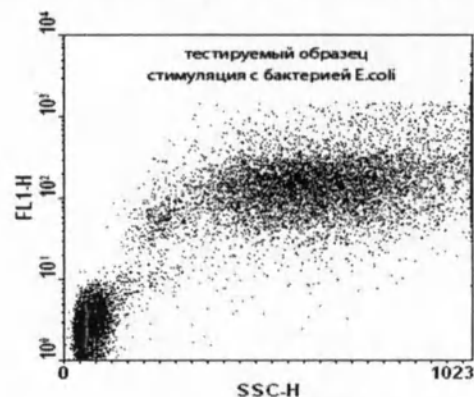


Рис. 1С Дот плот lin SSC / log FL1 тестового образца (стимуляция бактерией E.coli)

Типичный дот плот FSC/SSC и гистограммы FL1 теста на окислительный взрыв (время инкубации 10 + 10 минут при 37°C). Гистограммы контрольных образцов представлены слева (см. рис. 2A–2F).

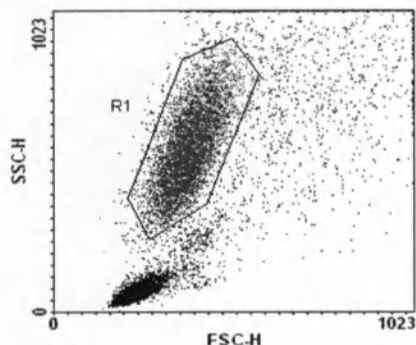


Рис. 2A Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция бактерией E.coli

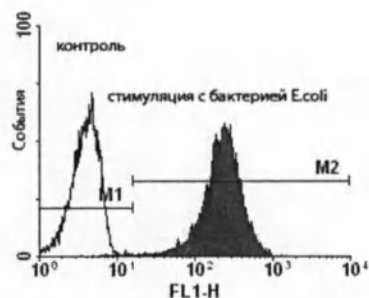


Рис. 2B Типичная гистограмма FL1, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция бактерией E.coli

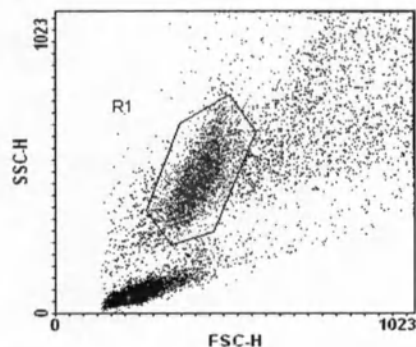


Рис. 2C Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция ФМА

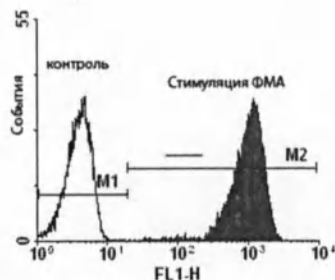


Рис. 2D Типичная гистограмма FL1, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция ФМА

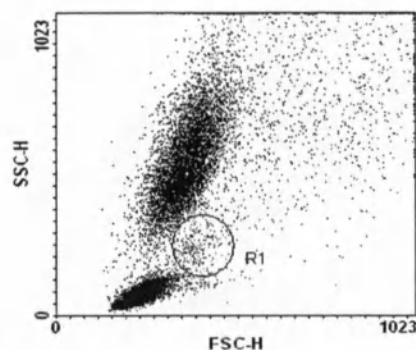


Рис. 2E Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на моноцитах, стимуляция бактерией E.coli



Рис. 2F Типичная гистограмма FL1, гейт установлен на моноцитах, стимуляция бактерией E.coli

ЗАМЕЧАНИЯ

1. Гепаринизированная кровь должна быть обработана в течение 24 ч после отбора проб. Образцы крови следует хранить при комнатной температуре до обработки.

2. Доступное количество субстрата определяется **временем инкубации диска субстрата** в отмывающем растворе (оптимально – в течение **20–30 мин**).
3. **Эозинофилы** (количество которых растет при аллергии и паразитарных инфекциях) демонстрируют **повышенную аутофлюоресценцию**, которую можно выявить в контрольной пробе при 0°C.
4. Фагоциты, инкубируемые при 37°C, отличаются по размеру и зернистости от клеток контрольного образца. Это необходимо помнить при определении областей интереса (гейтов или точечных областей) на графике светорассеяния. Кроме того, увеличение потери клеток может наблюдаться из-за их прилипания к пластиковой поверхности при температуре 37°C и аутолиза.
5. При постановке анализа полезно выполнять его параллельно дважды или трижды.
6. Предлагаемый порядок тестирования исследует процессы взрыва при **оптимальных условиях** (цельная кровь, опсонизированные бактерии, отсутствие этапов изоляции и т.д.). Таким образом, **при тестировании препаратов** на здоровых пациентах можно ожидать лишь небольшое увеличение активности взрыва *ex vivo* или *in vitro*. **При тестировании эффектов препаратов *in vitro*** полезно использовать слабый стимулятор **fMLP** либо при **изучении зависимости действия препаратов от времени** (инкубация с бактериями *E.coli* в течение 2,5 или 5 мин) и **от разведения бактерий** (пропорция 1 : 4 или 1 : 8, соотношение бактерий и лейкоцитов).
7. Бактерии уже опсонизированы, однако дополнительный эффект достигается за счет сыворотки в цельной крови. Это следует принимать во внимание при работе с образцами, отличными от цельной крови. Активность окислительного взрыва **изолированных моноцитов / макрофагов или клеточных линий** может быть изучена путем инкубации клеток с бактериями *E.coli* в культуральной среде, содержащей **5–20% эмбриональной телячьей крови** или **сыворотки крови человека**. При этом может быть потребоваться продление времени инкубации (60–240 мин).

ТОЧНОСТЬ МЕТОДИКИ

Внутрианалитическая точность данного метода анализа была определена путем трехкратного исследования цельной крови здоровых добровольцев (стимуляция бактерией *E. coli*).

	Диапазон значений	Средний КВ (%)	n
% окисляющихся гранулоцитов	99,60–99,95	0,1	6
GeoMean (Геометрическое среднее) FL1	154,50–395,75	4,8	6
% окисляющихся моноцитов	81,80–96,67	1,1	6
GeoMean FL1	49,60–88,65	6,5	6

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Нормальный диапазон активности окислительного взрыва гранулоцитов и моноцитов определяется на образцах свежей гепаринизированной цельной крови здоровых добровольцев.

Тип клетки	Стимулятор	% окисляемых клеток*	GeoMean FL1*
Гранулоциты	E.coli	97–100	150–500
	fMLP	1–10	-
	ФМА	98–100	300–1000
Моноциты	E.coli	70–100	50–100

* Результаты получены с помощью водяной бани со встряхиванием, значения GeoMean уменьшаются на 10–20% при использовании водяной бани без встряхивания.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Лаборатории должны создавать собственные диапазоны нормальных значений, используя свои условия испытаний.
2. Образцы должны содержать более 95% жизнеспособных клеток и к ним должна быть добавлена полная доза антикоагулянта. Клетки от старых и не содержащих полную дозу антикоагулянта образцов крови могут демонстрировать неспецифическое окрашивание. Причины этого явления – агрегаты тромбоцитов и мертвые клетки, из которых наблюдается утечка ДНК.
3. Образцы, готовые для измерения без добавления реагента G (раствор для окрашивания ДНК), стабильны в течение 1 часа на льду, но они систематически теряют интенсивность флуоресценции.
4. Флуорогенный субстрат дигидрородамин 123 чувствителен к окислению и, следовательно, вводится в ампулы в атмосфере инертного газа.

ВАЖНЫЕ ИНСТРУКЦИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

1. **Процесс фагоцитоза и окислительного взрыва в значительной степени зависит от температуры.** В процессе подготовки образцов необходимо **строго соблюдать температуру и время инкубации.** Термометр должен обеспечивать измерения с точностью до одной десятой градуса.
2. Также большое значение имеет воспроизводимость и стандартизация действий. Поэтому, пожалуйста, придерживайтесь данной инструкции и собственных уточнений.
3. Во внимание должны быть приняты любые изменения в проточном цитометре, которые влияют на чувствительность измерения флуоресценции и, следовательно, значение «GeoMean». Для ежедневной калибровки необходимо использовать стандартные калибровочные частицы (флуоресцентные микрогранулы).

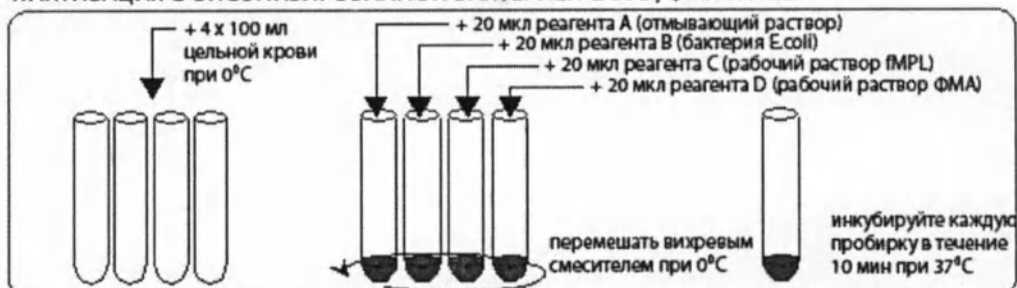
ССЫЛКИ

- (1) Male, D., Brostoff, J., Roth, D. & Roitt, I. 2006. Immunology, 7th изд. Elsevier Books, Oxford.
- (2) Sawyer, D.W., Donowitz, G.R. & G.L. Mandell. 1989. Polymorphonuclear neutrophils: An effective antimicrobial force. *Обз. Infect. Dis.* 11: S1532-S1544.
- (3) Donadebian, H. D. 1989. Congenital and acquired neutrophil abnormalities. In: Klempner, M.S. et al. (ред) Phagocytes and Disease. Kluwer, Dordrecht Boston New York, pp 103-118.
- (4) Smith, R.M. & J.T. Curnutte. 1991. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 77: 673 -686.
- (5) Dörmeyer, T.S., Raffel, B. Dörmeyer, J.M., Findhammer, S., Klein, S.A., Kabelitz, D. Hoelzer, D., Helm, E.B. & Rossol. 1995. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts. *Eur. J. Med. Res.* 1: 9-15.
- (6) Esparza, B., Sanchez H., Ruiz M., Barranquero M., Sabino, E. & F. Merino. 1996. Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry. *Immunol. Invest.* 25: 185-190.
- (7) Ringer, T.V. & J.J. Zimmermann. 1992. Inflammatory host responses in sepsis. *Crit. Care Clin.* 8: 163-189.
- (8) Heller, A.R., Groth, G., Heller, S.C., Breikreutz, R., Nebe, T., Quintel, M. & T. Koch. 2001. N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intense care unit patients. *Crit Care Med* 29: 272-276.
- (9) Miyagawa B. & H.-G. Klingemann. 1997. Phagocytosis and burst activity of granulocytes and monocytes after stem cell transplantation. *J. Lab. Clin. Med.* 129(6): 634-7.
- (10) Gessler, P., Nebe, T. Birle, A., Haas, N. & W. Kachel. 1996. Neutrophil respiratory burst in term and preterm neonates without signs of infection and in those with increased levels of C-Reactive Protein. *Pediatr. Res.* 39: 843-848.
- (11) Elbim, C., Chollet-Martin, S., Bailly, S., Hakim, J. & M.A. Gougerot-Pocidalo. 1993. Priming of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor α in whole blood: Identification of two polymorphonuclear neutrophil subpopulations in response to formyl-peptides. *Blood* 82: 663-640.

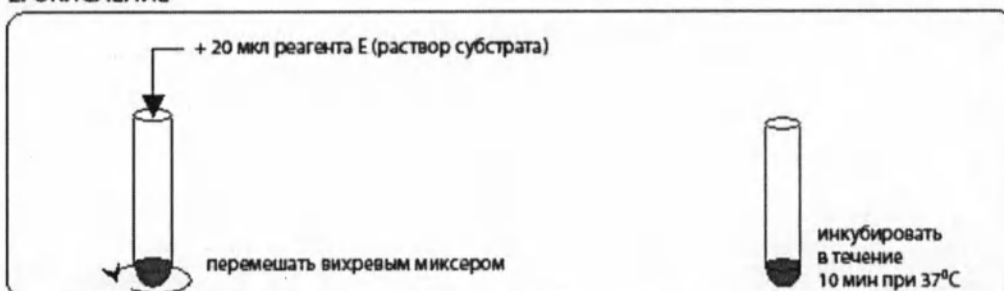
- (12) Menge, Ch., Neufeld, B., Hirt, W., Schmeer, N., Bauerfeind, R., Baljer, G. & L.H. Wieler. 1998. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. Vet. Immunol. Immunopathol. 62: 309-321.
- (13) Fachinger, V., Schlapp, T., Strube, W., Schmeer, N. & A. Saalmüller. 2000. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. J. Virol. 74: 7943-7951.
- (14) Kampen, A., Tollersrud, T., Larsen, S., Roth, J.A., Frank, D.E. & A. Lund. 2004. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology 97: 105-114.

PHAGOBURST™ – Процедура подготовки образцов

1. АКТИВАЦИЯ С ОПСОНИЗИРОВАННОЙ БАКТЕРИЕЙ E. COLI, ФМА И FMLP



2. ОКИСЛЕНИЕ



3. ЛИЗИС И ФИКСАЦИЯ



4. ОТМЫВКА И ОКРАШИВАНИЕ ДНК



5. ОБРАЗЦЫ ГОТОВЫ ДЛЯ АНАЛИЗА FACS

хранить при 0°C, без доступа света!

Измерять в течение 30 минут!

MIGRATEST™

CHEMOTAXIS

Набор реагентов для количественного определения хемотаксической активности нейтрофильных гранулоцитов

Содержит мембраны для клеточных культур и реагенты для проведения 24 тестов (12 пациентов)



Glycotope Biotechnology GmbH
Czernyring 22
69115 Heidelberg
Германия
Тел. +49 (0)62 21 91 05-0
Факс +49 (0)62 21 91 05-10
Эл. почта: info@glycotope-bt.com
www.glycotope-bt.com

Условные обозначения

	Медицинское устройство для диагностики <i>in vitro</i>		Включает реагенты для <n> тестов
	Декларация соответствия ЕС		Ограничение температур
	Место производства		Обратитесь к инструкциям по применению
	Номер по каталогу		Использовать до
	Номер партии		Мембраны для клеточных культур
	Содержит		Реагент*

* Подробное разъяснение символов, используемых в наименованиях компонентов реагентов, см. в главе «Материалы и реагенты».

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ И ОПИСАНИЕ

Этот тест позволяет количественно определить хемотаксическую функцию нейтрофильных гранулоцитов с помощью метода проточной цитометрии. По аналогии с методом камеры Бойдена, этот набор содержит многолуночные планшеты и мембраны, на которые предварительно нанесена культура клеток, для исследований хемотаксиса, пептид хемотаксиса N-формил-метионин-лейцин-фенилаланин (fMLP), реагент-антител, гранулы для подсчета и необходимые реагенты. Это позволяет определить количество нейтрофилов, мигрировавших через мембраны с культурой клеток по градиенту концентрации хемоаттрактанта fMLP. Вместе со снижением экспрессии молекул клеточной адгезии L-селектина можно проанализировать изменение формы клеток, анализируя изменения прямого рассеяния сигналов.

Более подробные указания – результат специфического опыта и точных анализов проверки. Наиболее важные этапы и советы выделены жирным шрифтом.

ПРИМЕНЕНИЕ

MIGRATEST™ предназначен для исследования изменений хемотаксической функции нейтрофилов при различных нарушениях и для оценки действия лекарственных препаратов на этот процесс.

Ненормальный хемотаксис наблюдался и описан при различных клинических расстройствах (3, 4). Как правило, эти нарушения сопровождаются рецидивирующими инфекциями кожи или дыхательных путей. Клинические синдромы с частыми инфекциями наблюдаются уже у младенцев. Функциональный дефект хемотаксиса снижает количество гранулоцитов, мигрирующих из кровотока в воспаленные ткани и, следовательно, количество активных клеток на участках воспаления.

Известные врожденные нарушения – нарушение адгезии лейкоцитов (5), синдром гипериммуноглобулина Е или синдром Джоба и синдром Чедиака-Хигаси (СЧХ). Эти нарушения связаны с пониженной хемотаксической активностью нейтрофильных гранулоцитов (6, 7).

Приобретенные нарушения наблюдаются при почечной недостаточности, сахарном диабете, циррозе печени (8) и болезни Ходжкина. Также подавляют хемотаксис циркулирующие

иммунные комплексы при ревматоидном артрите (10).

Различные препараты и иммуномодуляторы могут увеличить или снизить хемотаксическую активность гранулоцитов. Эти эффекты могут быть исследованы *in vitro* или *ex vivo* с помощью MIGRATEST™.

ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

Процесс фагоцитоза можно разделить на несколько основных этапов: хемотаксис, как начальный этап фагоцитоза (миграция фагоцитов к воспалительным очагам в направлении градиента хемотаксических факторов), прикрепление частиц к поверхности клетки фагоцитов, поглощение (фагоцитоз) и внутриклеточное уничтожение при помощи кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов (1, 2). Фагоцитоз полиморфноядерными нейтрофилами и моноцитами является важным средством защиты организма от бактериальных и грибковых инфекций.

MIGRATEST™ позволяет количественно определить хемотаксис нейтрофилов. Определяется количество клеток, мигрировавших через мембраны для клеточных культур в направлении градиента концентрации хемоаттрактанта fMLP при размере пор 3,0 мкм. Одновременно может быть измерена экспрессия L-селектина (11). Подавление этой молекулы клеточной адгезии коррелирует напрямую с активацией нейтрофилов путем воздействия хемотаксическими факторами. Изменение формы клеток предшествует миграции. Этот процесс измеряется анализом изменения прямого рассеяния сигналов при проточной цитометрии. Тестовый набор содержит хемоаттрактант fMLP, включения культуры клеток и необходимые реагенты. Лейкоциты изолируются от гепаринизированной цельной крови путем спонтанного осаждения поверх реагента А (среда выделения лейкоцитов) и помещаются на мембраны для клеточных структур. Хемотаксис проводится при температуре 37°C в направлении градиента fMLP в сравнении с контролем, где добавляется реагент В (инкубационный буфер). Затем клетки окрашиваются реагентом D (реагент-антител анти-L-селектина), который также содержит счетные гранулы. Непосредственно перед проточной цитометрией добавляется особый прижизненный краситель ДНК (реагент Е).

Таким образом, хемотаксис — начало многоступенчатого и многофакторного процесса фагоцитоза (1, 2). Всю цепь событий можно исследовать отдельно в контролируемых условиях, используя различные методики анализа: MIGRATEST™ для измерения хемотаксиса, PHAGOTEST™ для измерения поглощения микробов, BURSTTEST (PHAGOBURST™) для измерения окислительного взрыва.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Комплект реагентов содержит:

SORB

24 специально подготовленных **мембран для клеточных культур** (размер пор — 3,0 мкм), предустановленных в два 24-луночных планшета.

Реагент А

12 флаконов (1 мл), содержащих **среду разделения лейкоцитов** для выделения богатой лейкоцитами плазмы (БЛП).

Реагент В

1 флакон (20 мл), содержащий **инкубационный буфер**.

Реагент С

1 флакон (100 мкл), содержащий **пептид хемотаксиса (fMLP)** (200 x исходный раствор, 10 мкМоль). Для использования развести 5 мкл в 1 мл реагента В.

Реагент D

1 флакон (0,9 мл) **реагента антител и реагента подсчета** содержит моноклональные антитела анти-L-селектина-FITC и гранулы подсчета.

Реагент E

1 флакон (100 мкл), содержащий **прижизненный раствор для окраски ДНК**. Разводится 5 мкл в 250 мкл реагента В.

Набор реагентов не содержит следующие материалы, необходимые для анализа:

1. Пробирки для сбора крови, содержащей **антикоагулянт гепарин**.
2. 1 мл или 2 мл одноразовые пробирки (например, Eppendorf, № 0030 102.002 или Nunc, № 341173).
3. Одноразовые пробирки размером 12 x 75 мм (Falcon, Becton Dickinson № 352052) и соответствующие стойки.
4. Емкость со льдом и с крышкой.

Необходимая аппаратура:

1. Микропипетки объемом 20–200 мкл, 100–1000 мкл и одноразовые наконечники.
2. Диспенсер и наконечники для диспенсера.
3. Водяная баня.
4. Цифровой термометр.
5. Вихревой смеситель.
6. Проточный цитометр с длиной волны возбуждения 488 нм (аргоновый лазер).

ВНИМАНИЕ

1. Всегда рассматривайте образцы крови как потенциально инфицированные. Используйте одноразовые перчатки и защитную одежду при работе с образцами крови.
2. Реагент Е в качестве консерванта содержит азид натрия. В кислой среде, азид натрия образует азотистоводородную кислоту, чрезвычайно токсичное и летучее соединение. Растворы с азидом следует разбавлять водопроводной водой до утилизации, чтобы избежать отложений в системе канализации для предотвращения возникновения взрывоопасных ситуаций.
3. Реагенты С и Е содержат диметилсульфоксид (ДМСО). Диметилсульфоксид вызывает раздражение глаз, дыхательных путей и кожи (R36/37/38). Избегайте контакта с кожей и глазами (S24/25). В случае попадания в глаза, немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26).

ХРАНЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Набор следует хранить в темноте при температуре 2–8°C (в холодильнике). Мембраны для клеточных культур и многолуночные планшеты можно хранить при комнатной температуре. Рабочие растворы реагентов С и Е после использования необходимо утилизировать. Реагенты поставляются с консервантом, который не влияет на хемотаксическую функцию базофильных гранулоцитов. Реагенты стабильны в течение периода, указанного на этикетке упаковки, и при соответствующем хранении.

ПРОЦЕДУРА

1. Приготовление:

- 1.1 Разбавьте исходные растворы с реагентом В:
- реагентом С, в пропорции 1 : 200 (объем по мере необходимости, например, 5 мкл в 1 мл, 350 мкл на тест).
- реагентом Е, в пропорции 1 : 50 (например, 5 мкл в 250 мкл, 20 мкл на тест).
- 1.2 Прогрейте водяную баню до температуры 37°C (**необходим точный контроль температуры!**).
- 1.3 Подготовьте емкость со льдом.
- 1.4 Включите и откалибруйте проточный цитометр.

2. Изоляция лейкоцитов:

Соберите для исследования 5 мл гепаринизированной цельной крови у каждого пациента и у контрольного испытуемого. При заборе крови соблюдайте обычные правила асептики.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ кровь, в которую в качестве антикоагулянта добавлена EDTA или лимонная кислота!

- 2.1 Аккуратно наложите 1 мл гепаринизированной цельной крови поверх реагента А.
- 2.2 Оставьте флакон неподвижным при комнатной температуре. Через 40 мин образуются следующие фазы: верхняя фаза, содержащая лейкоциты и тромбоциты (**богатую лейкоцитами плазму = БЛП**), и нижняя фаза, содержащая эритроциты. При использовании более старых образцов крови оседание эритроцитов занимает больше времени.
- 2.3 Заберите прикл. 500 мкл богатой лейкоцитами плазмы (верхняя фаза), пипеттируйте клеточную взвесь в одну 1 мл или 2 мл тестовую пробирку. Для анализа хемотаксиса изолированные клетки необходимо использовать в течение 1 часа.

3. Настройка MIGRATEST™:

- 3.1 Подготовьте следующие образцы для каждого пациента или контрольного испытуемого, пипеттируя рабочий раствор реагента В или реагента С на дно лунок многолуночного планшета:

Отрицательный контрольный образец:

350 мкл реагента В

Положительный контрольный (тестируемый) образец:

350 мкл рабочего раствора реагента С

- 3.2 Поместите мембраны для клеточных культур в обе лунки. Добавьте **100 мкл богатой лейкоцитами плазмы** на каждую мембрану для клеточных культур.
- 3.3 Инкубация:
Многолуночный планшет инкубируется в течение **30 минут при температуре 37,0°C в водяной бане** без встряхивания.
- 3.4 Точно в конце инкубационного периода удалите ручную включения культуры клеток из многолуночного планшета. Добавьте клеточную взвесь из обеих лунок многолуночного планшета в две отдельные 5 мл пробирки (**пробирка 1 и пробирка 2**) и положите пробирки на лед. Кроме того, нестимулированные клетки богатой лейкоцитами плазмы служат контролем L-селектина. Для этого смешайте **20 мкл клеточной взвеси с мембраны для клеточных культур отрицательного контрольного образца со 180 мкл реагента В** и переместите эту смесь в третью 5 мл пробирку (**пробирку 3**).
- 3.5 Маркировка реагентом D:
Добавьте **20 мкл реагента D** в каждую пробирку (**3 пробирки на одного пациента**). Перемешайте вихревым смесителем и инкубируйте пробирки в течение **10 минут в емкости со льдом, закрытой для предотвращения попадания света**.
- 3.6 Прижизненное окрашивание:
Добавьте **20 мкл 1-кратного реагента Е** в пробирку, перемешайте и инкубируйте в течение **5 мин на льду** (в защищенной от света емкости со льдом).
Проведите измерения в клеточной взвеси в течение последующих 120 минут.

4. Анализ проточной цитометрии:

Клетки анализируются с помощью проточной цитометрии с использованием сине-зеленого света (488 нм аргоновый лазер, например, FACSCalibur™, PO CellQuest™).

Измерения:

Получите данные путем установления порога флуоресценции в канале FL3, установите первую область 1 на лейкоциты

и гранулы подсчета (дот плот диаграмма SSC/FL3, см. рис. 1A, 1B).

После активации гейта на области 1 установите вторую область 2 вокруг гранул подсчета (дот плот диаграммы SSC / FSC, см. рис 2A, 2B); начните получать данные. Окончите получать данные ровно на подсчитанном 2 000-м событии для того, чтобы количество гранулоцитов в контрольном образце можно было сопоставить с количеством гранулоцитов в положительном контрольном образце после стимуляции fMLP. Установите третью область 3 вокруг популяции гранулоцитов (дот плот диаграммы SSC / FSC, см. рис. 2A, 2B).

Оценка данных:

После настройки логического гейта на гранулоциты в области 1 и 3, анализируются следующие два параметра для каждого отрицательного контрольного образца и положительного контрольного (тестируемого) образца:

- (1) Количество клеток
- (2) Среднее значение сигнала FSC (только для тестового образца, сигнал управления FSC получают из L-селектина контрольного образца)

Оценка экспрессии L-селектина производится в отдельной гистограмме FL1. Для этого используйте L-селектин контрольного образца для установки маркера флуоресценции-1 (FL1) таким образом, чтобы положительными были менее прим. 15% клеток (см. рис. 3A). Затем определите процентное соотношение активированных гранулоцитов, показывающих снижение экспрессии L-селектина в исследуемом образце (см. рис. 3B). Также необходимо анализировать, управляющий сигнал FSC в L-селектине контрольного образца (участок точек диаграммы SSC / FSC). Для оценки данных воспользуйтесь следующей итоговой таблицей.

а- метр	Пробирка № 1	Пробирка № 2	Пробирка № 3
1	Количество о клеток	Количество клеток	-
2	-	Среднее значение сигнала FSC	Среднее значение сигнала FSC
3	-	Процент ное соотноше ние активи- рованных клеток	Процент- ное соотноше ние активи- рованных клеток

РИСУНКИ

Рекомендуется гейтирование при получении данных, данные получают с помощью установления порога флуоресценции в канале FL3 (красная флуоресценция > 630 нм). Область 1 настроена на лейкоциты и гранулы подсчета (см. рис. 1A и 1B).

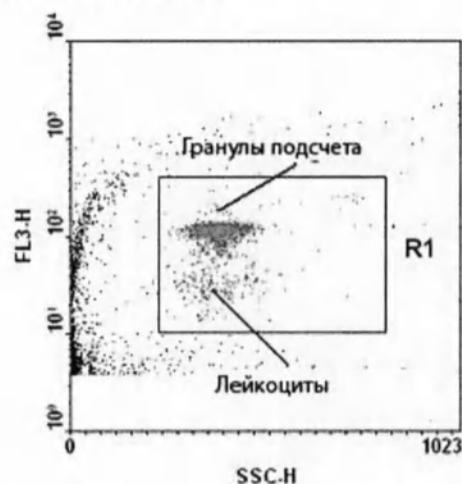


Рис. 1A Область 1 настроена на лейкоциты и гранулы подсчета, отрицательный контрольный образец

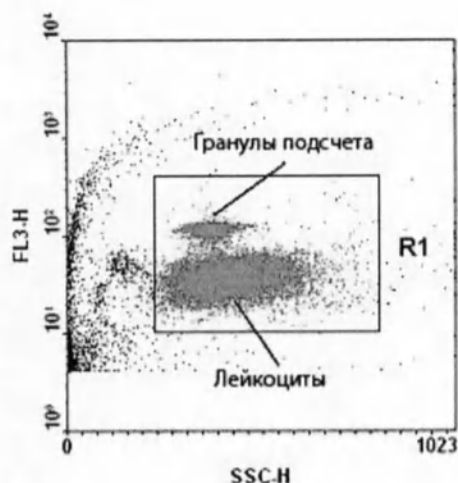


Рис. 1B Область 1 настроена на лейкоциты и гранулы подсчета, гранулы **положительного** контрольного образца

Типичный дот плот SSC/FSC, отображаемый при получении данных и анализе, гейт установлен на область 1. Область 2 настроена на гранулы подсчета, область 3 настроена на гранулоциты (см. Рис. 2A и 2B)

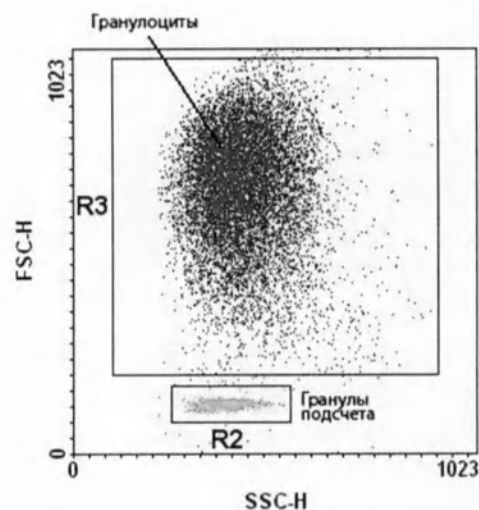


Рис. 2B Область 2 установлена на гранулы подсчета, область 3 установлена на гранулоциты, **положительный контрольный образец**
Примечание: Изменение формы гранулоцитов (FSC-H- сигнал)!

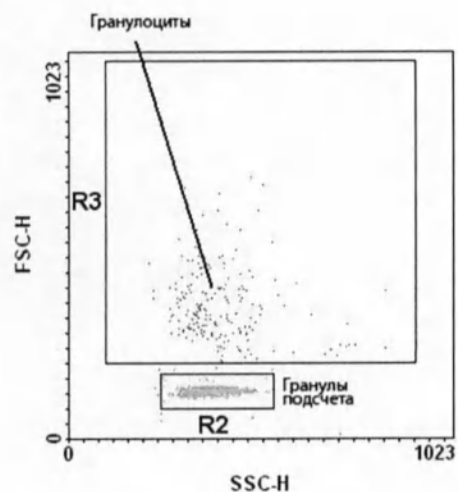


Рис. 2A Область 2 установлена на гранулы подсчета, область 3 установлена на гранулоциты, **отрицательный контрольный образец**

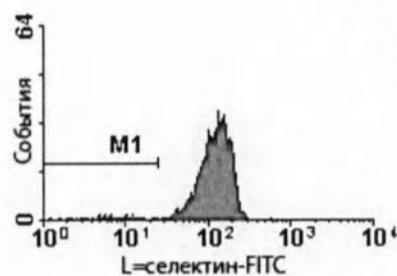


Рис. 3A Гистограмма FL1 популяции гранулоцитов в области 3, **L-селектина** контрольного образца

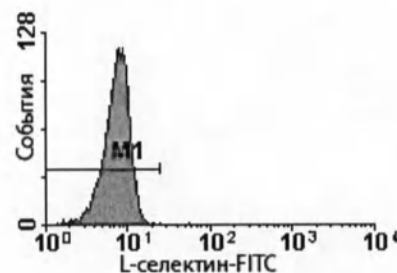


Рис. 3B Гистограмма FL1 популяции гранулоцитов в области 3, **тестовый образец**
Заметка: Увеличение процентного соотношения активированных клеток указывает на снижение экспрессии L-селектина

ЗАМЕЧАНИЯ

1. Гепаринизированная цельная кровь должна быть обработана в течение 24 ч после отбора проб. Образцы крови следует хранить при комнатной температуре до обработки.
2. При настройке тестирования полезно двойные определения.
3. Предлагаемая схема испытаний позволяет исследовать процесс хемотаксиса после инкубационного периода от 30 мин. Для получения более высоких значений параметра «количество мигрировавших через включения клеточной культуры» необходимо увеличить время инкубации.
4. При тестировании воздействия препаратов на усиление или ингибирование хемотаксической функции, полезно сначала инкубировать клеточную взвесь с тестируемым препаратом. После этого клетки стимулируются хемоаттрактантом fMLP.

ТОЧНОСТЬ МЕТОДИКИ

Внутрианалитическая точность данного анализа была определена на трех тестовых образцах (стимулированных fMLP), взятых от здоровых добровольцев.

	Количество клеток после миграции	Среднее значение сигнала FSC	% активированных гранулоцитов
Диапазон значений	3 002–14 162	615–713	97,01–99,44
Средний КВ (%)	9,1	1,9	0,2
n	15	10	10

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Нормальный диапазон хемотаксической активности гранулоцитов и моноцитов определяется на образцах свежей гепаринизированной цельной крови здоровых людей.

	Количество клеток после миграции	Среднее значение сигнала FSC	% активированных клеток
L-селектин контроль	-	250–450	< 10%
Контрольный образец	100–1 500	-	-
Тестируемый образец	2 500–15 000	500–750	> 90%

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Лаборатории должны создавать собственные диапазоны нормальных значений, используя свои условия испытаний.
2. Образцы должны содержать более 95% жизнеспособных клеток и к ним должна быть добавлена полная доза антикоагулянта.
3. Готовые для измерения образцы стабильны в течение 2 часов на льду после добавления реагента Е (прижизненный раствор для окраски ДНК).

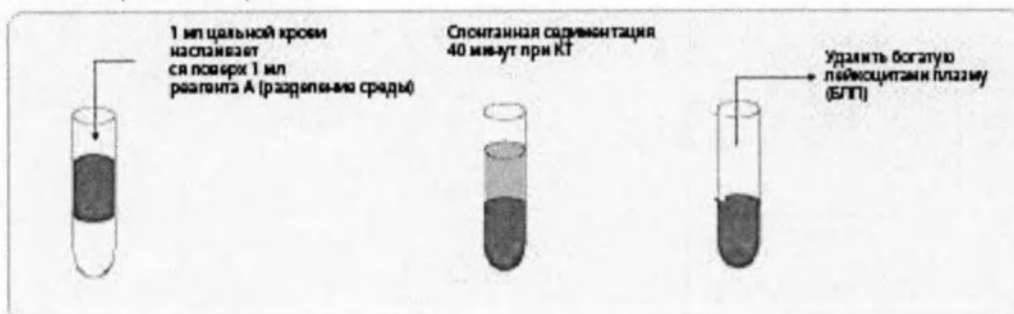
ССЫЛКИ

- (1) Roitt IM, Brostoff J, Male DK. 1996. Immunology, 4th изд Gower Medical Publishing Ltd., London.
- (2) Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell, GL. 1989. Polymorphonuclear neutrophils: An effective antimicrobial force. Обз. Infect. Dis. 11: S1532-S1544.
- (3) Donadebian HD, 1989. Congenital and acquired neutrophil abnormalities. In: Klempner, M.S. et al. (ред) Phagocytes and Disease. Kluwer, Dordrecht Boston New York, pp 103-118.
- (4) Robinson JP, Carter WO. 1993. Flow cytometric analysis of granulocytes. In: Bauer, K.D. et al. (ред) Clinical Flow Cytometry, Principles and Applications. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 405-433.

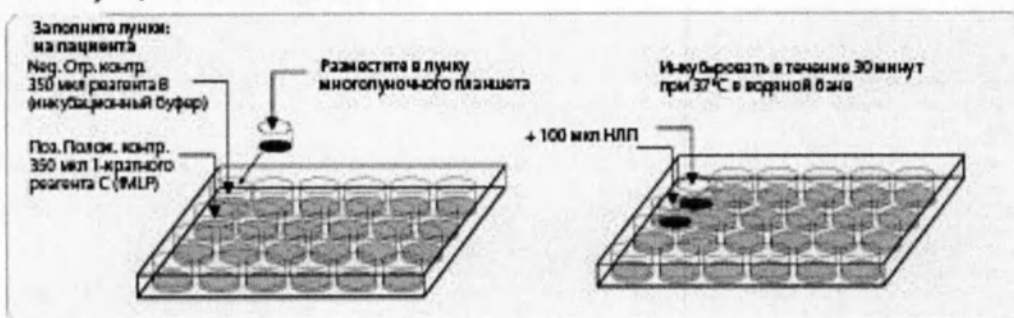
- (5) Anderson DC, Springer TA. 1987. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150, 95 glycoproteins. *Annu Rev Med* 38: 175-194.
- (6) Gallin JI, Wright DG, Malech HL, Davis JM, Klempner MS, Kirkpatrick CH. 1980. Disorders of phagocyte chemotaxis. *Ann Intern Med* 92: 520-538.
- (7) Ottonello L, Dapino P, Pastorino G, Dallegri F, Sacchetti C. 1995. Neutrophil dysfunction and increased susceptibility to infection. *Eur J Clin Invest* 25:687-92.
- (8) Ward PA, Berenberg JL. 1974. Defective regulation of inflammatory mediators in Hodgkin's disease. Supernormal levels of chemotactic-factor inactivator. *N Engl J Med* 290: 76-80.
- (9) DeMeo AN, Anderson BR. 1972. Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients. *N Engl J Med* 286: 735-740.
- (10) Attia WM, Clark HW, Brown TM. 1982. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte migration by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Allergy* 48: 21-24.
- (11) Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. 1990. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci, USA* 87: 2244-2248

MIGRATEST™ – Процедура подготовки образцов

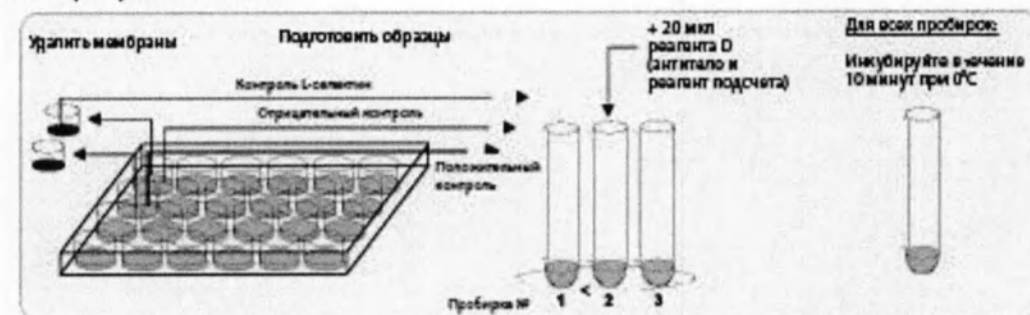
1. Изоляция лейкоцитов



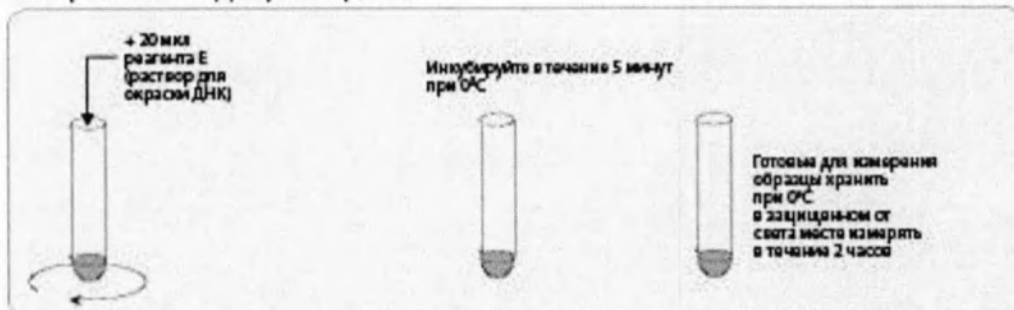
2. Стимулирование и хемотаксис



3. Маркировка клеток



4. Окрашивание ДНК, Измерения



PHAGOTEST™

Набор реагентов для количественного определения фагоцитарной активности моноцитов
и гранулоцитов в гепаринизированной цельной крови человека

Набор реагентов содержит опсонизированные бактерии E.coli, помеченные флуоресцеин
изотиоцианатом, и реагенты для проведения 100 тестов



Glycotope Biotechnology GmbH
Czernyring 22
69115 Heidelberg
Германия
Тел. +49 (0)62 21 91 05-0
Факс +49 (0)62 21 91 05-10
Эл. почта: info@glycotope-bt.com
www.glycotope-bt.com

Условные обозначения

	Медицинское устройство для диагностики <i>in vitro</i>		Включает реагенты для <n> тестов
	Декларация соответствия ЕС		Ограничение температур
	Место производства		Обратитесь к инструкциям по применению
	Номер по каталогу		Использовать до
	Номер партии		Реагент*
	Содержит		

* Подробное разъяснение символов, используемых в наименованиях компонентов реагентов, см. в главе «Материалы и реагенты».

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ И ОПИСАНИЕ

Данный набор реагентов предназначен для количественного определения лейкоцитарного фагоцитоза в гепаринизированной цельной крови. В состав набора входят опсонизированные бактерии *E.coli*, меченые флуоресцеином (FITC) и необходимые реагенты. Измеряется общий процент фагоцитирующих моноцитов и гранулоцитов (поглощение одной или более бактерий на клетку) и фагоцитарная активность отдельных клеток (число бактерий на клетку).

Исследование фагоцитоза необходимо производить с помощью проточной цитометрии. При проведении количественного анализа крайне необходима точность работы, особенно, когда требуется ежедневное сравнение результатов. Более подробные указания – результат специфического опыта и точных анализов проверки. Наиболее важные этапы выделены жирным шрифтом. Также прилагается графический отчет теста.

ПРИМЕНЕНИЕ

PHAGOTEST™ предназначен для исследования фагоцитарной активности, обнаруживаемой при различных расстройствах, и для оценки действия лекарственных препаратов.

Аномальный фагоцитоз может возникать при различных клинических нарушениях (4, 5, 6). Дефекты могут быть связаны как с самим нейтрофилом, так и с дефектами иммуноглобулинов, либо системы комплемента. В настоящее время известны следующие врожденные нарушения: дефицит интегрина лейкоцитов, дисфункция актина и дефекты компонентов системы комплемента (7, 8, 9). Эти нарушения могут привести к повышенной восприимчивости к инфекциям из-за дефектов нейтрофильного фагоцитоза. Приобретенные нарушения, связанные с изменением фагоцитарной активности, могут наблюдаться при травмах, сахарном диабете, почечной недостаточности, системных инфекциях либо остром панкреатите. Ослабленный фагоцитоз был обнаружен у пациентов с рецидивирующей бактериальной инфекцией кожи, придаточных пазух и легких (10), у больных с раневой инфекцией после ожогов (11), у больных СПИДом (12), у новорожденных (13), у пожилых людей (14) или у пациентов, проходящих лечение глюкокортикоидами (15) или анестетиками (16).

Усилить фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов можно с помощью различных иммуномодуляторов (цитокинов, например интерлейкина-2 или γ -интерферона, молочнокислых бактерий и растительных экстрактов, например, травы *Echinaceae Purpureae*). Эффективность таких воздействий может быть исследована как *in vitro*, так и *ex vivo* (17, 18).

PHAGOTEST™ также позволяет изучать фагоцитарную активность промиелоцитарных лейкозных клеток HL-60, изолированных моноцитов или макрофагов.

Тестовый набор совместим с кровью мышей, крыс, кроликов, собак, крупного рогатого скота и кровью других видов (19–22).

ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

Фагоцитоз полиморфноядерными нейтрофилами и моноцитами является важным средством защиты организма от бактериальных и грибковых инфекций. Процесс фагоцитоза можно разделить на несколько основных этапов: хемотаксис (миграция фагоцитов к очагам воспаления), прикрепление частиц к поверхности клетки фагоцитов, поглощение (фагоцитоз) и внутриклеточное уничтожение при помощи кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов (1, 2, 3).

PHAGOTEST™ предназначен для количественного определения лейкоцитарного фагоцитоза (поглощения бактерий). Измеряется процент фагоцитов, поглотивших бактерию, и их активность (количество бактерий на клетку). Набор для исследования фагоцитоза содержит опсонизированные бактерии *E.coli*, меченые флуоресцеином, и прочие необходимые реагенты. Гепаринизированную цельную кровь инкубируют с реагентом В (бактерии *E.coli*, меченые флуоресцеин изотиоцианатом) при 37°C, отрицательный контрольный образец оставляют на льду. Фагоцитоз останавливают, поместив образцы на лед и добавив к ним реагент С (подавляющий раствор). Этот раствор позволяет различать прикрепленные к клетке и поглощенные клеткой бактерии, подавляя FITC-флуоресценцию бактерий, прикрепленных к поверхности клетки, но не влияя на флуоресценцию поглощенных частиц. После двух этапов отмывки с реагентом А (отмывающим раствором) эритроциты удаляются путем добавления реагента D (лизирующего раствора). Раствор

для окрашивания ДНК (Реагент Е), который добавляется непосредственно перед анализом методом проточной цитометрии, исключает артефакты агрегации бактерии или клеток.

Бактерии *E.coli* опсонизированы с иммуноглобулином и комплементом смешанной сыворотки. Клетки фагоцитарной системы (моноциты, полиморфноядерные нейтрофилы) имеют рецепторы для компонента комплемента (C3b) и для постоянной части молекулы иммуноглобулина (Fc), опосредующие адгезию бактерий к поверхности клеток. Используя опсонизированные и неопсонизированные бактерии, которые также доступны, одновременно можно измерить опсонизирующую способность и фагоцитоз. Таким образом, можно определить, является ли ненормальный фагоцитоз следствием нарушения процесса опсонизации, либо дефектом поглощающей способности фагоцитов.

Фагоцитоз и последующее расщепление — многоступенчатый и многофакторный процесс (1, 2, 3). Поэтому для его исследования в контролируемых условиях применяются разные наборы: MIGRATEST™ для измерения хемотаксиса, PHAGOTEST™ для измерения поглощения микробов, BURSTTEST (PHAGOBURST™) для измерения окислительного взрыва. Важными факторами являются: степень опсонизации, температура, время инкубации и соотношение бактерий и лейкоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Набор реагентов содержит:

Реагент А

1 флакон выпаренной соли для растворения в 1 л бидистиллированной воды, дает 1 л готового к использованию 1 х отмывающего раствора.

Реагент В

1 флакон (2 мл) взвеси стабилизированных и опсонизированных *E.coli*, меченых FITC, 1 х раствор, готовый к использованию, прибл. 2 х 10⁹ бактерий на 1 мл.

Реагент С

1 флакон (10 мл) подавляющего раствора для подавления флуоресценции бактерий, прикрепленных снаружи клетки, синий раствор реагента, 1 х раствор.

Реагент D

1 флакон (20 мл) лизирующего раствора (10 х исходного раствора для хранения), для получения 200 мл 1 х раствора после разведения в пропорции 1 : 10 с дважды дистиллированной водой для лизирования эритроцитов и одновременной фиксации лейкоцитов.

Реагент Е

1 флакон (20 мл) раствора для окраски ДНК для цитометрического различия бактерий во время анализа лейкоцитов, розовый раствор реагента, 1 х раствор.

Набор реагентов не содержит следующие материалы, необходимые для анализа:

1. Пробирки для сбора крови, содержащие антикоагулянт гепарин.
2. Одноразовые пробирки размером 12 x 75 мм (Falcon, Becton Dickinson № 352052) и соответствующие стойки.
3. Колбы (500 мл и 1000 мл) для отмывающего раствора (реагента А) и 1 х лизирующего раствора (реагента D).
4. Емкость со льдом и с крышкой.
5. Дважды дистиллированная вода или вода для инъекций для приготовления отмывающего раствора (реагента А), а также для разбавления 10 х лизирующего раствора (реагента D).

Необходимая аппаратура:

1. Микропипетки с изменяющимся объемом 20–200 мкл, 100–1000 мкл и одноразовые наконечники.
2. Диспенсер и наконечники для диспенсера.
3. Диспенсеры на бутылки для отмывающего раствора и 1 х лизирующего раствора.
4. Водяная баня.
5. Цифровой термометр.
6. Вихревой смеситель.
7. Охлаждающая центрифуга с качающимся ротором и вкладышами для пробирок размером 12 x 75 мм.
8. Проточный цитометр с длиной волны возбуждения 488 нм (аргоновый лазер).

ВНИМАНИЕ

1. Образцы крови должны всегда рассматриваться как потенциально инфицированные. Используйте одноразовые перчатки и защитную одежду при работе с образцами крови.
2. Реагент А содержит хлорацетамид и натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты. Хлорацетамид вреден при вдыхании и попадании на кожу (R22) и может вызвать раздражение на коже (R43). Возможен риск нарушения фертильности (R62). Не вдыхайте пыль (S22). Используйте соответствующую защитную одежду, перчатки и защиту глаз/лица (S36/37/39). Натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты вызывает раздражение глаз (R36) и может вызывать длительные неблагоприятные эффекты в водной среде (R 52/53). Не допускайте попадания в окружающую среду. См. специальные инструкции/инструкции по технике безопасности (S61).
3. Реагент D содержит диэтиленгликоль и формальдегид. Формальдегид вреден при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании (R20/21/22). Он вызывает раздражение глаз, дыхательных путей и кожи (R36/37/38). Возможен риск необратимых последствий (R40). Может вызывать раздражение кожи при контакте (R43). В случае попадания в глаза, немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью (S26). Используйте соответствующую защитную одежду и перчатки (S36/37). При несчастном случае или при возникновении недомогания, немедленно обратитесь за медицинской помощью (S45). Используйте только в хорошо проветриваемых помещениях (S51). Диэтиленгликоль вреден при проглатывании (R22). При проглатывании немедленно обратитесь за медицинской помощью и покажите эту упаковку или этикетку (S46).
4. Краситель ДНК загрязняет пипетки и систему доставки образца проточного цитометра и, возможно, влияет на анализ иммунофлуоресценции, особенно в случае антител, помеченных фикоэритрином. Разбавленный гипохлорит натрия (0,5–1,5%) устраняет загрязнения от красителя ДНК.

ХРАНЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Набор следует хранить в темноте при температуре 2–8°C (в холодильнике). Перед использованием тщательно перемешайте бактерии (вихревым смесителем) или при помощи шприца с узкой иглой. Реагенты поставляются с консервантом, который не влияет на фагоцитоз. Реагенты стабильны в течение периода, указанного на этикетке упаковки, и при соответствующем хранении.

1. Приготовление:

- 1.1 Растворите соли для отмывающего раствора (реагент А) в 1 л бистиллированной воды для приготовления отмывающего раствора.
- 1.2 Разведите исходный раствор реагента D в пропорции 1: 10 в бистиллированной воде (объем по мере необходимости, 2 мл на тест).
- 1.3 Подготовьте емкость со льдом.
- 1.4 Прогрейте водяную баню до температуры 37°C (**необходим точный контроль температуры!**).
- 1.5 Включите и откалибруйте проточный цитометр.

2. Настройка PHAGOTEST™:

2.1 Дозирование:

Гепаринизированная цельная кровь осторожно перемешивается (вихревым смесителем) и аликвотируется на дне 5 мл пробирки, **100 мкл на тест**.

Кровь не должна оставаться на боковых стенках пробирки, как и при анализе иммунофлуоресценции.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ кровь, в которую в качестве антикоагулянта добавлена EDTA или лимонная кислота!

Перед добавлением бактерий, образцы крови следует инкубировать в емкости со льдом в течение 10 минут, чтобы охладить их до 0°C.

2.2 Активация:

Тщательно перемешайте **предварительно охлажденные бактерии E.coli (Реагент В)** (вихревым смесителем) и добавьте 20 мкл на тест, а также контрольный образец к образцу цельной крови.

2.3 Инкубация:

Все пробирки перемешиваются еще раз. **Контрольный образец остается на льду. Тестовый образец инкубируется в течение 10 минут при температуре 37,0°C на водяной бане. Водяная баня должна быть закрыта и предварительно прогрета. Следует тщательно контролировать время инкубации и температуру.**

2.4 Подавление флюоресценции:

Точно в конце периода инкубации все образцы, находящиеся в одной стойке, одновременно извлекаются из водяной бани и помещаются на лед, чтобы остановить фагоцитоз. К каждому образцу добавляется **100 мкл холодного реагента С (подавляющего раствора)**. Перемешайте образцы, используя вихревой смеситель.

2.5 Отмывка:

Добавьте **3 мл отмывающего раствора (реагент А)** в пробирки. Отцентрифугируйте пробирки (5 мин, при 250 g, при 2–8°C). Удалите надосадочную жидкость. Образцы отмываются еще один раз с добавлением **3 мл отмывающего раствора (реагент А)** (5 мин, при 250 g, при 2–8°C). Удалите надосадочную жидкость.

2.6 Лизис и фиксация:

Образцы цельной крови лизируются и фиксируются **2 мл предварительно нагретого до комнатной температуры 1 x реагента D (лизирующего раствора)**. Смешайте вихревым миксером и инкубируйте образцы в течение **20 минут при комнатной температуре**. Отцентрифугируйте клетки (5 мин, при 250 g, при 2–8°C). Удалите надосадочную жидкость.

2.7 Отмывка:

Добавьте **3 мл отмывающего раствора (реагент А)** в пробирки. Отцентрифугируйте пробирки (5 мин, при 250 g, при 2–8°C). Удалите надосадочную жидкость.

2.8 Окрашивание ДНК:

Добавьте **200 мкл раствора для окрашивания ДНК (реагент Е)** в пробирки. Смешайте и инкубируйте **10 минут на льду** (в емкости со льдом без доступа света).

Проведите измерения в клеточной взвеси в течение последующих 60 минут.

3. Анализ методом проточной цитометрии

Клетки анализируются методом проточной цитометрии с использованием сине-зеленого излучения (488 нм аргоновый лазер).

Измерение:

Во время сбора данных «живой» гейт устанавливается на **гистограмме красной флуоресценции** на тех событиях, которые содержат, по крайней мере, такое же количество ДНК, что и диплоидные клетки человека (т.е. исключение скопления бактерий, имеющих те же свойства рассеивания света, что и лейкоциты. См. **рис. 1А**). Кроме того, бактерии могут быть исключены из анализа путем установления **порога флуоресценции по FL2 и FL3 каналу**.

Соберите **10 000–15 000 лейкоцитов на образец**.

Оценка данных:

Анализируется процент клеток, совершивших фагоцитоз (гранулоцитов и моноцитов), а также их средняя интенсивность флуоресценции (количество поглощенных бактерий). С этой целью **соответствующий кластер лейкоцитов гейтируется** программным обеспечением по гистограмме светорассеяния (lin FSC и lin SSC, см. **рис. 2А, 2С**) и затем анализируется **гистограмма зеленой флуоресценции (FL1)** (см. **рис. 2В, 2D**).

Для этого используйте контрольный образец для установления маркера флуоресценции-1 (FL1) таким образом, чтобы менее 1–3% событий были позитивными. Процент фагоцитирующих клеток в исследуемом образце может быть определен путем подсчета числа событий над этой позицией маркера. Среднее значение флуоресценции коррелирует с количеством бактерий на один лейкоцит.

РИСУНКИ

Рекомендуемая гистограмма/дот плот (точечный график), отображаемые во время сбора данных (см. рис. 1A, 1B, 1C).

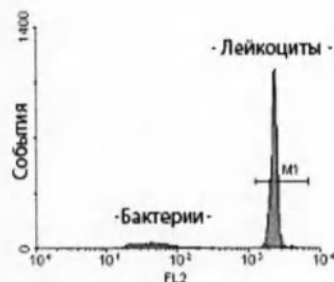


Рис. 1A Живой гейт на ДНК лейкоцитов (гистограмма FL2)

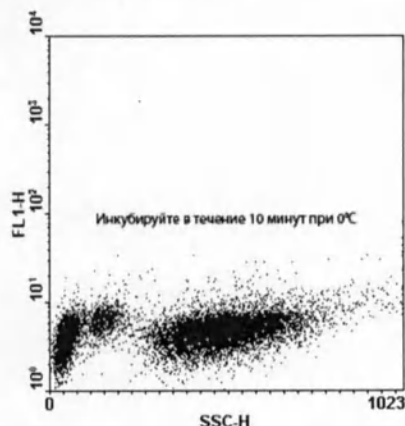


Рис. 1B Дот плот lin SSC / log FL1 контрольного образца (0°C)

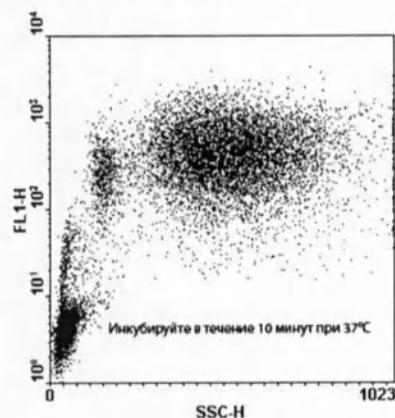


Рис. 1C Дот плот lin SSC / log FL1 тестового образца (37°C)

Типичный дот плот FSC/SSC и гистограммы FL1 фагоцитарного теста (время инкубации 10 мин при 37°C) Гистограммы контрольного образца при 0°C представлены слева (см. рис. 2A, 2B, 2C, 2D).

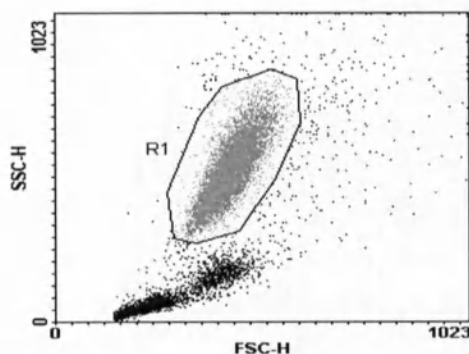


Рис. 2A Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на гранулоцитах

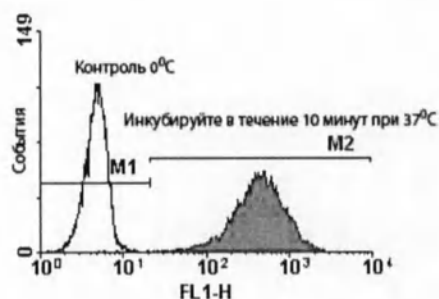


Рис. 2B Типичная гистограмма FL1, гейт установлен на гранулоцитах

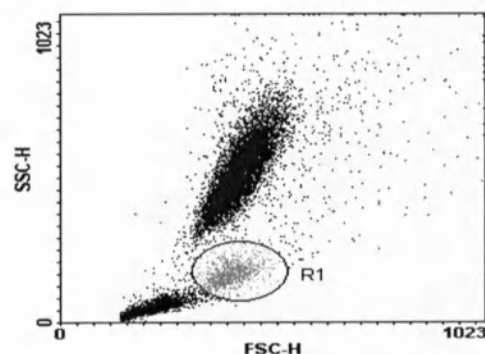


Рис. 2C Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на моноцитах

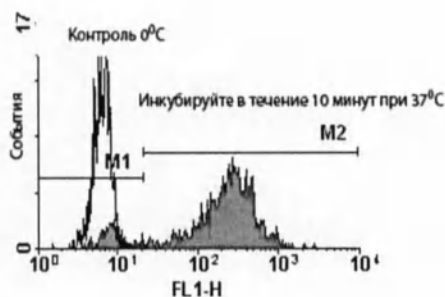


Рис. 2D Типичная гистограмма FL1, гейт установлен на моноцитах

ЗАМЕЧАНИЯ

1. Гепаринизированная кровь должна быть обработана **в течение 24 ч после отбора проб**. Образцы крови следует хранить при **комнатной температуре** до обработки.
2. **Эозинофилы** (количество которых растет при аллергии и паразитарных инфекциях) демонстрируют **повышенную аутофлуоресценцию**, которую можно выявить в контрольной пробе при 0°C.
3. Фагоциты, инкубируемые при 37°C, отличаются по размеру и зернистости от клеток контрольного образца при 0°C. Это необходимо помнить при определении областей интереса (гейтов или точечных областей) на графике светорассеяния. Кроме того, увеличение потери клеток может наблюдаться из-за их прилипания к пластиковой поверхности при температуре 37°C и аутолиза.
4. При постановке анализа полезно выполнять его параллельно дважды или трижды.
5. Предлагаемый порядок тестирования исследует **процесс фагоцитоза при оптимальных условиях** (опсонизированные бактерии, отсутствие этапов изоляции и т.д.). Таким образом, при тестировании препаратов на здоровых пациентах можно ожидать лишь небольшое увеличение фагоцитарной активности *ex vivo* или *in vitro*. **Тестирование эффектов препаратов *in vitro* может быть полезным при изучении зависимости действия препаратов от времени** (инкубация с бактериями E.coli-FITC (реагент В) в течение 2,5 или 5 мин) и **от разведения бактерий** (пропорция 1 : 4 или 1 : 8).

6. Бактерии уже опсонизированы, однако дополнительный эффект достигается за счет сыворотки в цельной крови. Это следует принимать во внимание при работе с образцами, отличными от цельной крови.

Фагоцитарная активность **HL-60 промиелоцитарных лейкозных клеток** или **изолированных моноцитов или макрофагов** может быть изучена путем инкубации клеток с бактериями E.coli, мечеными FITC, в культуральной среде, содержащей **5–20% эмбриональной телячьей сыворотки** или сыворотки крови человека. При этом может быть потребоваться **продление времени инкубации** (120–240 мин).

7. В качестве реагента F также доступны **неопсонизированные бактерии E.coli, меченые FITC**. Их можно использовать в качестве стимуляторов, чтобы **проверить опсонизирующую способность сыворотки пациента**.

ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

Внутрианалитическая точность данного метода анализа была определена путем трехкратного исследования цельной крови здоровых добровольцев.

	Диапазон значений	Средний КВ (%)	n
% фагоцитирующих гранулоцитов	96,80–99,59	0,2	6
GeoMean (геометрическое среднее) FL1	264,30–616,60	1,5	6
% фагоцитирующих моноцитов	78,4–95,5	1,1	6
GeoMean FL1	161,90–310,30	3,6	6

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Нормальный диапазон фагоцитарной активности гранулоцитов и моноцитов был определен на **образцах свежей гепаринизированной цельной крови** здоровых добровольцев.

Тип клетки	% фагоцитирующих клеток*	GeoMean FL1*
Гранулоциты	95–99	250–600
Моноциты	65–95	150–350

* Результаты получены с помощью водяной бани со встряхиванием, значения GeoMean уменьшаются на 20–30% при использовании водяной бани без встряхивания.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Лаборатории должны создавать собственные диапазоны нормальных значений, используя свои условия испытаний.
2. Образцы должны содержать более 95% жизнеспособных клеток и к ним должна быть добавлена полная доза антикоагулянта. Клетки от старых и не содержащих полную дозу антикоагулянта образцов крови могут демонстрировать неспецифическое окрашивание. Причины этого явления – агрегаты тромбоцитов и мертвые клетки, из которых наблюдается утечка ДНК.
3. Соотношение бактерий (примерно 4×10^7 на 20 мкл) к лейкоцитам (в 100 мкл цельной крови) составляет 50 : 1 при условии количества лейкоцитов в – крови 8 000/мкл и 80 : 1 при 5 000/мкл. Для образцов с количеством белых кровяных клеток, отличающимся от нормального диапазона (4 000–10 000), необходимо корректировать количество добавляемых бактерий.
4. Образцы, готовые для измерения без добавления реагента Е (раствора для окрашивания ДНК), стабильны в течение 24 часов на льду, но они систематически теряют интенсивность флуоресценции.

ВАЖНЫЕ ИНСТРУКЦИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

1. Процесс фагоцитоза в значительной степени зависит от температуры. В процессе подготовки образцов необходимо строго соблюдать температуру и время инкубации. Термометр должен обеспечивать измерения с точностью до одной десятой градуса.
2. Также большое значение имеет воспроизводимость и стандартизация действий. Поэтому, пожалуйста, придерживайтесь данной инструкции и собственных уточнений.
3. Во внимание должны быть приняты любые изменения в проточном цитометре, которые влияют на чувствительность измерения флуоресценции и, следовательно, значение «GeoMean». Для ежедневной калибровки необходимо использовать стандартные калибровочные частицы (флуоресцентные микрогранулы).

ССЫЛКИ

- (1) Male, D., Brostoff, J., Roth, D. & Roitt, I. 2006. Immunology, 7th изд. Elsevier Books, Oxford.
- (2) Sawyer, D.W., Donowitz, G.R. & G.L. Mandell. 1989. Polymorphonuclear neutrophils: An effective antimicrobial force. Обз. Infect. Dis. 11: S1532-S1544.
- (3) Janeway, C.A., Travers, P. & M. Walport. 2005. Immunobiology. 6th изд. Garland Publishing.
- (4) Rotrosen, D. & J.I. Gallin. 1987. Disorders of phagocyte function. Ежег. Обз. Immunol. 5: 127-150.
- (5) Donadebian, H. D. 1989. Congenital and acquired neutrophil abnormalities. In: Klempner, M.S. et al. (ред) Phagocytes and Disease. Kluwer, Dordrecht Boston New York, pp 103-118.
- (6) Robinson, J.P. & W.O. Carter. 1993. Flow cytometric analysis of granulocytes. In: Bauer, K.D. et al. (ред) Clinical Flow Cytometry, Principles and Applications. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 405-433.
- (7) Colten, H.R. & F.S. Rosen. 1993. Complement deficiencies. Ежег. Обз. Immunol. 10: 809-824.

- (8) Fischer, A., Lisowska-Groszpiere, B., Anderson, D.C. & T.A. Springer. 1988. Leukocyte adhesion deficiency: Molecular basis and functional consequences. *Immunodef. Rev.* 1: 39-54.
- (9) Malech H.L. & D.D. Hickstein. 2007. Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. *Curr. Opin. Hematol.* 14: 29-36.
- (10) Bassoe, C.-F. 1984. Flow cytometric studies on phagocyte function in bacterial infections. *Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. C*, 92: 167 - 171.
- (11) Crogan, J.B. 1976. Altered neutrophil phagocytic function in burn patients. *J. Trauma* 16: 734-738.
- (12) Dobmeyer, T.S., Raffel, B. Dobmeyer, J.M., Findhammer, S., Klein, S.A., Kabelitz, D. Hoelzer, D., Helm, E.B. & Rossol. 1995. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts. *Eur. J. Med. Res.* 1: 9-15.
- (13) Wilson, C.B. Development immunology and role of host defenses in neonatal infant. In: Remington, J.S. & J.O. Klein, ред. 1990. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia, WB Saunders: 17:67.
- (14) Esparza, B., Sanchez H., Rulz M., Baranquero M., Sabino, E. & F. Merino. 1996. Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry. *Immunol. Invest.* 25: 185-190.
- (15) Goulding, N.J., Euzger, H.S., Butt, S.K. & M. Perretti. 1998. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflammation Research.* 47: 158-165
- (16) Heller, A., Heller S., Blecken R. Urbaschek, R. & T. Koch. 1998. Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 42: 518-526.
- (17) Schiffrin, E.J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J.M. & A. Donnet-Hughes. 1995. Immunomodulation of human blood cells following ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci (USA)* 78: 491-497.
- (18) Brosche, T. & D. Platt. 1995. Nutritional factors and age-associated changes in cellular immunity and phagocytosis: A mini review. *Aging Immunol Infect Dis* 6: 31-42.
- (19) Menge, Ch., Neufeld, B., Hirt, W., Schmeer, N., Bauerfeind, R., Baljer, G. & L.H. Wieler. 1998. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62: 309-321.
- (20) Fachinger, V., Schlapp, T., Strube, W., Schmeer, N. & A. Saalmüller. 2000. Pox-virus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J. Virol.* 74: 7943-7951.
- (21) Hoffmann-Jagielska, M., Winnicka, A., Jagielski, D. & R. Lechowski. 2003. Influence of some cellular aspects of the immune system in cats. *Veterinary Research Communications* 27: 643-652.
- (22) Kampen, A., Tollersrud, T., Larsen, S., Roth, J.A., Frank, D.E. & A. Lund. 2004. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 97: 105-114.

PHAGOTEST™ – Процедура подготовки образцов

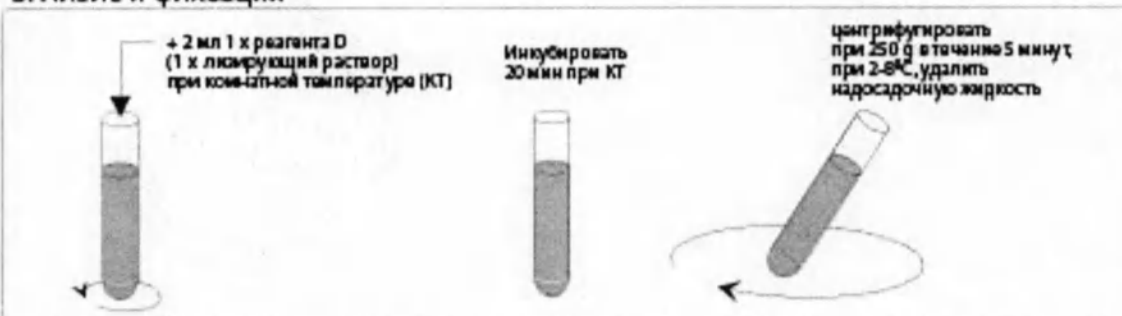
1. Пометка



2. Подавление



3. Лизис и фиксация



4. Промывка и окрашивание ДНК



Прошито и
пронумеровано 33 листов

