

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-миристат-13-ацетат (ФМА) и пептид хемотаксиса N-формил-метионин-лейцин-фенилаланин (fMLP) в качестве стимуляторов, дигидрородамин 123 (DHR) в качестве флюорогенной подложки и необходимые реагенты. Тест определяет процентное соотношение фагоцитов, вырабатывающих реактивные окислители (преобразование дигидрородамина 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 трансплантантов 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-миристат-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, дигидрорадамин 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 дигидрорадамина 123. Реакцию останавливают, добавляя лизирующий раствор (реагент F), удаляющий эритроциты, что приводит к частичному связыванию лейкоцитов. После одной отмытки 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, припл. 1-2 х 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-миристат-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 дигидрорадамин 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 х 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. Микropипетки 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-миристал-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 анализах 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 аргоновый 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**).

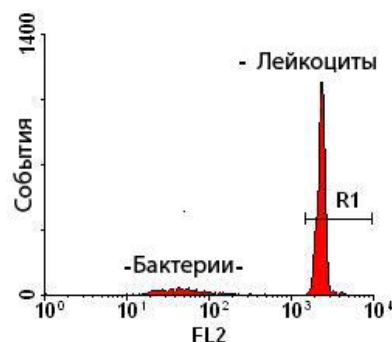


Рис. 1А Живой гейт на ДНК лейкоцитов (гистограмма FL2)

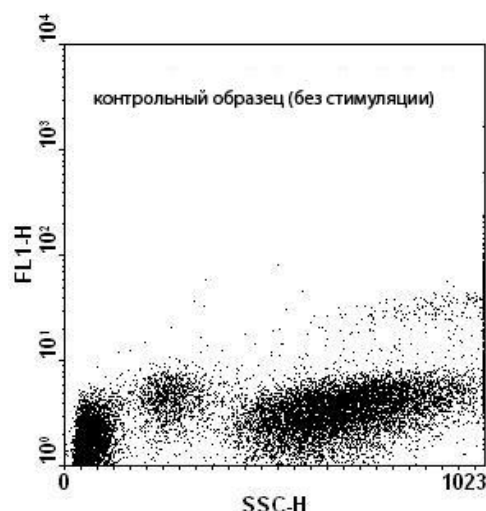


Рис. 1В Дот плот lin SSC / log FL1 контрольного образца (без стимуляции)

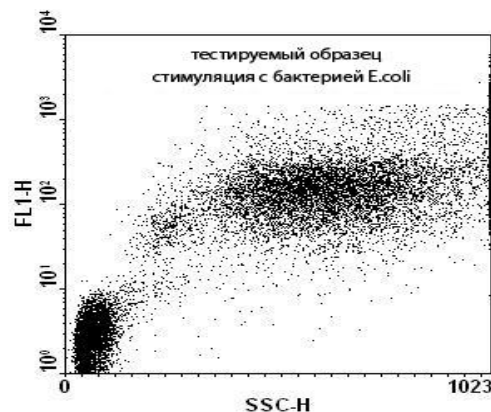


Рис. 1С Дот плот lin SSC / log FL1 тестового образца (стимуляция бактерией E.coli)

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).

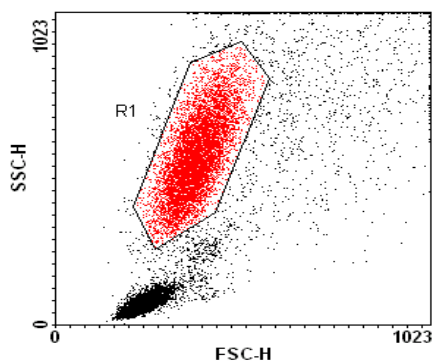


Рис. 2A Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция бактерией E.coli

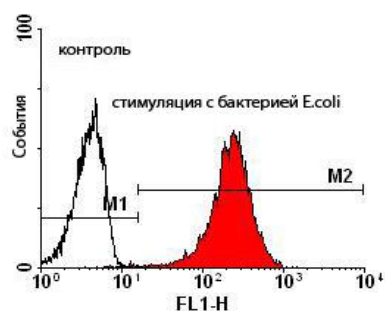


Рис. 2B Типичная гистограмма FL1, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция бактерией E.coli

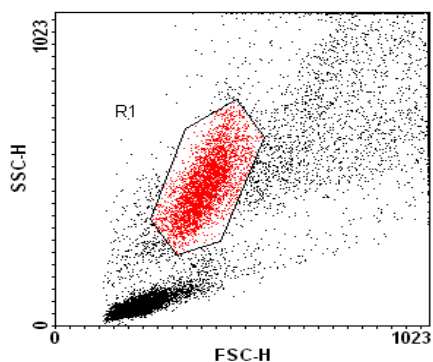


Рис. 2C Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция ФМА

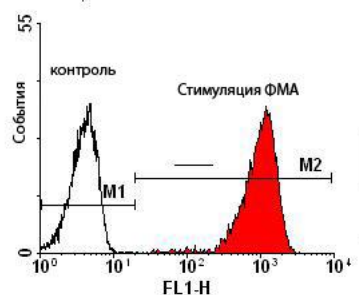


Рис. 2D Типичная гистограмма FL1, гейт установлен на гранулоцитах, стимуляция ФМА

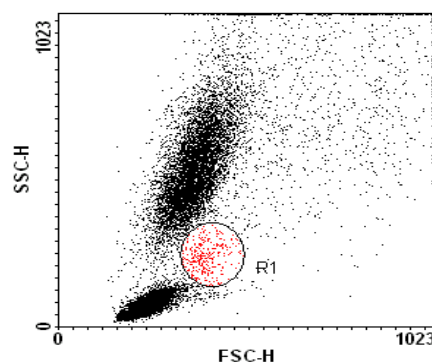


Рис. 2E Типичный дот плот FSC/SSC, гейт установлен на моноцитах, стимуляция бактерией E.coli



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).

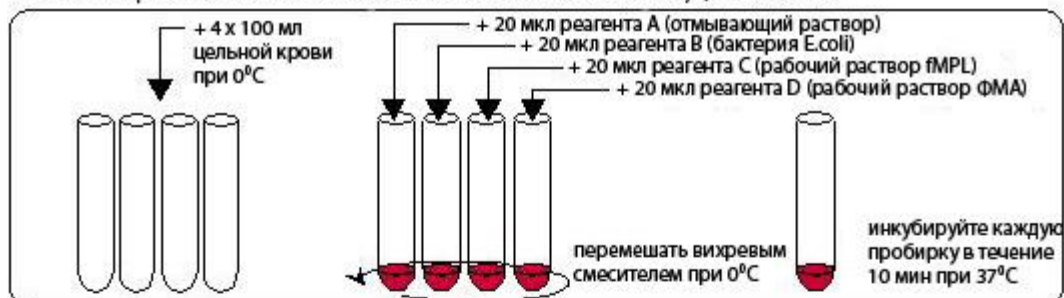
ССЫЛКИ

- (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) 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.
- (6) Esparza, B., Sanchez H., Rulz 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.

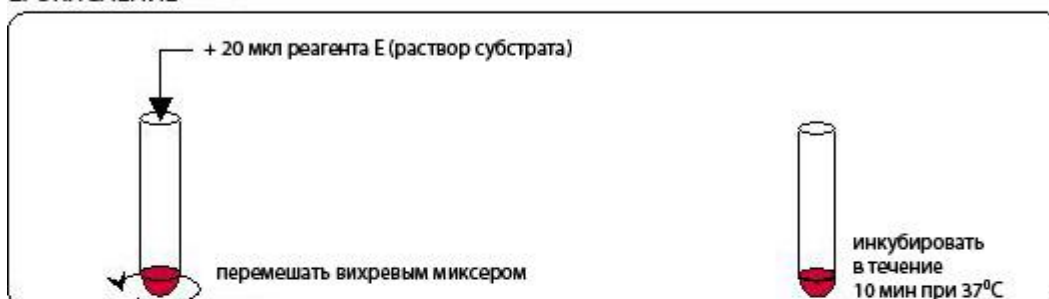
- (12) Menge, Ch., Neufeld, B., Hirt, W., Schmeer, N., Bauerfeind, R., Baljer, G. & L.H. Wieler. 1998. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. Vet. Immunol. Immunopathol. 62: 309-321.
- (13) Fachinger, V., Schlapp, T., Strube, W., Schmeer, N. & A. Saalmüller. 2000. 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 FMPL



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!