

BasoFlowEx Kit

Kat.č. ED7043

1. Určený účel prostředku

Účel použít

BasoFlowEx Kit je určený pro **testování alergické reakce zprostředkované protilátkami IgE** analýzou expozice proteinu CD63 na povrchu bazofilů po jejich stimulaci alergemem v lidské periferní krvi s heparinem pomocí průtokové cytometrie. Stimulaci je možné provádět pomocí komerčně dostupných alergenů.

Souvislost s fyziologickým nebo patologickým stavem

Klíčovým bodem v diagnostice alergií je co nejpečlivější stanovení příčinného alergenu. Běžně užívaná metoda kožních prick testů (SPT) se vyznačuje nízkou spolehlivostí, a kromě toho může u pacientů vyvolat zhoršení alergického onemocnění. Proto je žádoucí využívat testy *in vitro*, jako je detekce specifických protilátek IgE v séru (sIgE) či analýza aktivních markerů bazofilů. Specifická stanovení sIgE je v případě většiny alergenů dostatečně vysoká, ale senzitivita bývá pouze kolem 75%, kromě toho u některých alergenů (zejména potravin a léků) je senzitivita i specifická detekce sIgE podstatně nižší. Oproti tomu se test aktivace bazofilů (BAT) vyznačuje nejen velmi vysokou specificitou, ale i vysokou senzitivitou, a to i v případě řady problematických antigenů.

2. Princip testu

Princípem testu je vyvolání aktivace bazofilů *in vitro* v přítomnosti senzibilizujícího alergenu a následné měření expozice aktivčního znaku bazofilů (proteinu CD63) na buněčném povrchu pomocí monoklonálních protilátek metodou průtokové cytometrie. Pokud je ve vzorku přítomno dostatečné množství alergenně specifických molekul IgE, které jsou navázané na povrch bazofilů prostřednictvím vysokofinitního receptoru FcγRI, přidaný alergen způsobí přemostění receptorů, které vede k plné aktivaci bazofilů spojené s procesem vyhlídi obsahu zánětlivých mediátorů z cytoplazmatických granulí vně buňky (degranulaci). Degranulace má mimo jiné za následek expozici transmembránového proteinu cytoplazmatických granulí CD63 na povrch bazofilů. Ten je následně detekován monoklonální protilátkou anti-CD63 (klon MEM-259) konjugovanou s FITC. Populace bazofilů je ve směsi leukocytů identifikována monoklonální protilátkou anti-CD203c (klon NP4D6) konjugovanou s PE. Pozitivní kontrolu představuje vzorek, ve kterém jsou bazofily aktivované monoklonální protilátkou anti-IgE, která zastupuje stimulační účinek specifického alergenu, a chemotaktickým peptidem N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), který aktivuje bazofily přes fMLP receptor (FPR1).

3. Poskytované materiály

ED7043-1 Stimulation Buffer – 5 kusů vialek obsahujících lyofilizovaný stimulační pufr, jedna vialka je určená pro stimulaci 20 zkumavek.

ED7043-2 Stimulation Control – 2 kusy vialek obsahujících lyofilizovaný stimulant pozitivní kontroly, jedna vialka je určená pro stimulaci 25 pozitivních kontrolních vzorků.

ED7043-3 Staining Reagent – 1 vialka obsahující 2 ml koktejlů protilátek: anti-CD63 značená FITC + anti-CD203c značená PE.

ED7043-4 Lysing Solution – lahvička s lyzačním roztokem, 30 ml.

4. Nutné, ale neposkytované materiály

Alergeny
5ml zkumavky pro barvení buněk (12 × 75 mm)
Fosfátový pufr (PBS)
Ultračistá demineralizovaná voda

5. Nutná zařízení

Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
Vortex
Termostat umožňující inkubovat zkumavky při 37 °C
Centrifuga s rotorem pro zkumavky
Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC) a při 575 nm (PE)

6. Skladování a manipulace

BasoFlowEx Kit skladujte při teplotě 2-8 °C. Soupravu je nutno chránit před slunečním zářením. Doba použitelnosti je vyznačena na jednotlivých reagenciích i na krabici soupravy. Informace o skladování rekonstituovaných reagencií jsou uvedeny v oddíle 9.

7. Vyskyt, předběžná opatření

a omezení

- Souprava je určena pro *In vitro* diagnostiku v laboratořích mimo USA a Kanadu. Souprava je ve shodě s evropskou směrnicí pro *In vitro*

diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC.

- Nepoužívejte reagencie po uplynutí doby použitelnosti.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Vzorky krve jsou považovány za potenciálně infekční materiál, pracujte výhradně v ochranných rukavicích a při práci dodržujte správné postupy pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem.
- Staining Reagent (ED7043-3) nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Reagencie Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje formaldehyd a metanol.

H-věty

H302+H312+H332: Zdraví škodlivý při požití, při styku s kůží a při vdechování.

H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci.

H351: Podezření na vyvolání rakoviny.

P-věty

P270: Při používání tohoto výrobku nejezte, nepijte ani nekuřte.

P280: Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

P301+312: PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302+352: PŘI STYKU S KÚŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdlem.

P305+351+338: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P501: Odstraňte obsah/obal v autorizovaném místě sběru nebezpečných odpadů.

- Úplné informace o potenciálních nebezpečích a bezpečném způsobu práce s výrobkem najdete v bezpečnostním listu produktu.
- Vzorek krve může obsahovat nedostatečné množství bazofilů pro provedení testu.
- Některé vzorky krve mohou obsahovat bazofily, které nejsou stimulovatelné.
- Kvalita použitého stimulačního alergenu ovlivňuje spolehlivě provedení testu.
- Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není pravidelně kalibrován a udržován.
- Pokud nejsou fluorescenční signály správně kompenzovány nebo nejsou správně umístěny regiony (gate) pro pozitivní a negativní buňky, pak mohou být data nesprávně interpretována.
- Vzorky analyzujte nejpozději do 2 hodin po obarvení.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nedodržení doporučeného postupu měření a analýzy může ovlivnit výsledky testů.

8. Vzorek

Vyšetření se provádí na krvi odebrané do zkumavky s heparinem.

Krev musí být odebrána do zkumavky s heparinem. Postupujte podle pokynů výrobce zkumavky a ujistěte se, že je dosaženo správného plicního objemu krve.

Antikoagulanty EDTA a citrát ruší analýzu. Vzorky krve skladujte při laboratorní teplotě. Vzorky krve zpracujte nejdéle do 8 hodin po odběru za předpokladu, že jsou skladovány za laboratorní teploty.

Během barvení vzorků chraňte obsah zkumavek před kontaminací vzdušnými alergeny (pyly, prachové částice), které mohou falešně zvýšit počet aktivovaných bazofilů

9. Postup

Příprava reagentů

- Lyofilizovaný stimulační pufr (**Stimulation Buffer**) před použitím rekonstituujte pomocí 2 ml demineralizované vody. Nespotřebované množství stimulačního pufry je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle 30 dní, případně zamrazit při ≤ -20 °C pro vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.
- Lyofilizovaný stimulant pozitivní kontroly (**Stimulation Control**) před použitím rekonstituujte pomocí 0,25 ml demineralizované vody. Nespotřebované množství stimulantu je možné skladovat v lednici (2-8 °C) nejdéle 30 dní, případně zamrazit při ≤ -20 °C pro vhodných alikvotech pro další použití. Vyvarujte se opakovaného zamrazování a rozmrazování roztoku.
- Ostatní reagencie (**Staining Reagent, Lysing Solution**) jsou připravené pro okamžité použití.

Postup zkoušky

Pro vyšetření jednoho vzorku krve je třeba připravit **negativní kontrolu, pozitivní kontrolu** a **potřebný počet zkumavek stimulovaných testovanými alergeny**. Pro stimulaci je možné použít různé komerční alergeny. Vzorky příprave

podle následujícího postupu:

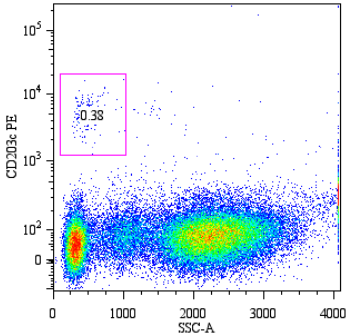
- Do zkumavek určených pro:

- alergemem stimulovaný vzorek** napipetujte 10 µl alergenu,
 - negativní kontrolní vzorek** napipetujte nic,
 - pozitivní kontrolní vzorek** napipetujte 10 µl rekonstituovaného stimulantu (**Stimulation Control**), nebo použijte jednotestovou zkumavku s lyofilizovaným alergemem (EXBIO).
- Do všech zkumavek napipetujte 100 µl rekonstituovaného stimulačního pufry (**Stimulation Buffer**).
 - Do všech zkumavek napipetujte 100 µl krve s heparinem a zkumavky promíchejte pomocí vortexu.
 - Zkumavky inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 15 minut ve vodní lázni nebo 25 minut v inkubátoru.
 - Poté do všech zkumavek napipetujte 20 µl koktejlů protilátek (**Staining Reagent**), zkumavky promíchejte pomocí vortexu a inkubujte 20 minut v lednici při 2-8 °C nebo na ledu.
 - Poté přidejte 300 µl lyzačního roztoku (**Lysing Solution**), zkumavky promíchejte pomocí vortexu a inkubujte přibližně 5-10 minut při laboratorní teplotě, dokud nedojde k lyzi červených krvinek.
 - Do zkumavek přidejte 3-4 ml demineralizované vody, promíchejte pomocí vortexu a inkubujte přibližně 5-10 minut při laboratorní teplotě, dokud nedojde k lyzi červených krvinek.
 - Centrifugujte zkumavky 5 minut při 300 g.
 - Odstraňte supernatant a resuspendujte sediment pomocí 0,2-0,4 ml pufry PBS.
 - Vzorky změřte průtokovým cytometrem nejpozději do 2 hodin od obarvení.

Analýza v průtokovém cytometru

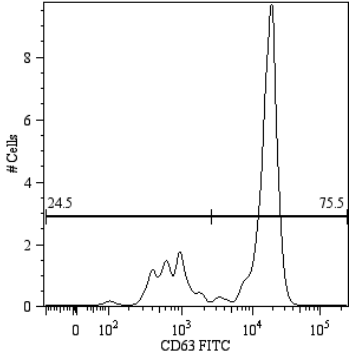
Obarvené vzorky analyzujte průtokovým cytometrem. Jelikož by mělo být analyzováno minimálně 200 bazofilů, změřte cytometrem 50 000-10 0000 událostí od každého vzorku. Proveďte kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat (FITC a PE kanál). Naměřená data zobrazte v grafu side-scatter (SSC) versus intenzita fluorescence v PE kanálu (FL2) a ohraničte vhodným regionem populaci bazofilů, které jsou CD203c pozitivní (CD203c^{pos}) a mají nízký SSC (SSC^{low}), jak je znázorněno na obrázku 1 (kvůli odlišné expresi CD203c u nestimulovaného a stimulovaného vzorku je třeba umístění regionu upravit pro každý vzorek zvlášť).

Obr. 1 Ohraničení populace bazofilů (CD203c^{pos} / SSC^{low}).

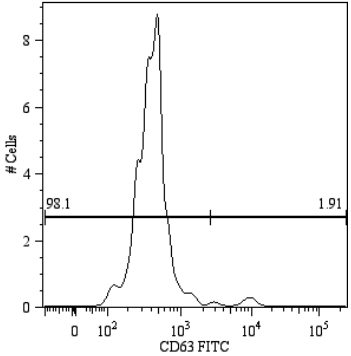


Poté zobrazte ohraničené bazofily v histogramu, kde na ose X je vynesena intenzita fluorescence ve FITC kanálu (FL1), jak je znázorněno na obrázcích 2a,b,c. Pomocí negativní kontroly nastavte region odpovídající CD63^{dim} populaci, která představuje neaktivované bazofily. Poté spočítejte procentuální zastoupení aktivovaných bazofilů, které jsou CD63^{bright}, v jednotlivých alergemem stimulovaných vzorcích a u pozitivní kontroly.

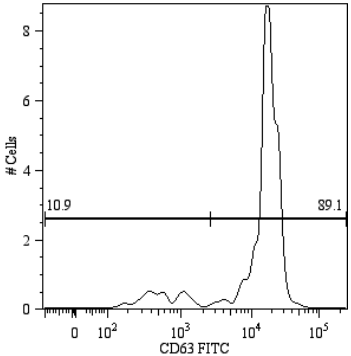
Obr. 2a Histogram populace bazofilů po stimulaci alergemem.



Obr. 2b Histogram populace bazofilů negativní kontroly.



Obr. 2c Histogram populace bazofilů pozitivní kontroly.



Výpočty a interpretace výsledků

Vypočítejte procento aktivovaných bazofilů (CD63^{bright}) ve vzorcích stimulovaných alergemem a ve vzorku pozitivní kontroly.

Při hodnocení testu je třeba brát v úvahu hranici pozitivity testu pro jednotlivé skupiny alergenů, kterou by si měla ustanovit každá laboratoř. Hranicí hodnota pozitivity testu bývá obvykle nastavena následovně:

inhalační a potravinové alergeny	≥ 15 %
jedl blankokřídleho hmyzu	≥ 10 %
léky	≥ 5 %
	≥ 5 %

Hodnocení testu není možné provést, pokud pozitivní kontrola vykazuje méně než 20 % aktivovaných bazofilů.

10. Vlastnosti analytické funkce

Přesnost (opakovatelnost a reprodukovatelnost)

Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření byla stanovena duplicitním měřením šesti senzitivizujícími alergeny nezávisle pěti operátory na jednom vzorku krve za stejných experimentálních podmínek. Metodou analýzy rozptýlu byly stanoveny následující parametry opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření:

CV _{opakovatelnost}	= 2,4 %
CV _{reprodukovatelnost}	= 3,4 %

11. Vlastnosti klinické funkce

Specifická a Citlivost

Specifická a Citlivost metody byla stanovena srovnávacím měřením soupravy BasoFlowEx Kit se dvěma komerčně dostupnými BAT soupravami (A, B). Srovnání bylo provedeno v rutinním provozu klinické laboratoře na 100 vzorcích.

Parametr	BasoFlowEx vs. Souprava A	BasoFlowEx vs. Souprava B	Souprava B vs. Souprava A
Citlivost (%)	96,6	85,9	94,7
Specifická (%)	82,9	79,3	69,2

Očekávané hodnoty

Průměrná hodnota počtu aktivovaných bazofilů změřených v pozitivních kontrolách 20 krevních vzorků je uvedena v následující tabulce. Počet aktivovaných bazofilů u vzorků stimulovaných alergemem se může teoreticky pohybovat v rozmezí 0-100 %.

Parametr	Průměr (%)	SD	CV (%)
Aktivované bazofily	77,3	19,4	25,1

12. Odkazy

1. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Vallon C, Guerin JC (1998) Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. Inflamm Res. 47(10): 401-408

2. Sanz ML, Sánchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, Diéguez I, De Weck AL (2001) Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus and Lolium perenne. Clin. Exp. Allergy 31(7): 1007-1013

3. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Slodowy S, Merk HF, Sachs B (2003) CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. Clin. Exp. Allergy 33(5): 607-614

4. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ (2004) In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? Clin. Exp. Allergy 34(3): 332-339

5. Valent P, Hauswirth AW, Natter S, Sperr WR, Bühring HJ, Valenta R (2004) Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. Methods 32(3): 265-270

13. Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

14. Ochranné známky

n/a

15. Historie revizí

- Verze 1, ED7043_IFU_v1

První vydání.

- Verze 2, ED7043_IFU_v2

Změna textu v sekci Upozornění: Text „Souprava je určena pro profesionální uživatele“ odstraněno a nahrazeno „Souprava je určena pro In vitro diagnostiku a vyhovuje požadavkům NV 453/2004 Sb., které je harmonizováno s evropskou směrnicí pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky 98/79/EC“.

- Verze 3, ED7043_IFU_v3

Varovný text byl změněn z „reagencie Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje < 5% formaldehydu“ na „reagencie Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje formaldehyd a methanol“.

R- a S-věty a symboly nebezpečnosti byly změněny na H- a P-věty a GHS symboly podle nařízení (ES) č. 1272/2008.

- Verze 4, ED7043_IFU_v4

Text „(např. určených pro kožní testy)“ byl odstraněn z části Použití soupravy.

Text „(např. pro kožní testy)“ byl odstraněn z části

Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván.

Text „např.: vhodně ředěné (1-10x) alergeny

používané pro kožní testy“ byl odstraněn z části

Postup testu.

- Verze 5, ED7043_IFU_v5

Změna loga výrobce a vzhledu Návodu k použití. Přidáno omezení pro skladování: "Chránit před slunečním zářením".

Do sekce Vzorek byl přidán text „Postupujte podle pokynů výrobce zkumavky a ujistěte se, že je dosaženo správného plnicího objemu krve“.

Do oddílu Skladování a manipulace byl přidán text „Informace o skladování rekonstituovaných reagentů jsou uvedeny v oddíle 9“.

Změna PSC výrobce z 25242 na 25250.

V sekci „Výstrahy, předběžná opatření a omezení“ byl přidán text „Úplné informace o potenciálních nebezpečích a bezpečném způsobu práce s výrobkem najdete v bezpečnostním listu produktu.“

- Verze 6, ED7043_IFU_v6

Byl upřesněn text definující omezení použití produktu.

- Verze 7, ED7043_IFU_v7

V sekci Postup zkoušky doplněna v bodě 1 následující věta: "nebo použijte jednotestovou zkumavku s lyofilizovaným alergenem (EXBIO)."

exbio

BasoFlowEx Kit

100 testů | Kat.č. ED7043



Návod k použití

Verze ED7043_IFU_v7_CS

Datum vydání: 08-04-2024

CS

Symboly



Katalogové číslo



Kód dávky



Použití do data



Omezení teploty



Chránit před slunečním zářením



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



Označení shody CE



Čtěte návod k použití



Výrobce

Produkt je určen pro In Vitro diagnostické použití. In vivo diagnostické nebo terapeutické aplikace jsou zakázány.

Výrobky nesmějí být použity k dalšímu prodeji nebo převodu třetím osobám ani jako samostatný výrobek, ani jako součást výroby jiného výrobku bez písemného souhlasu EXBIO Praha, a.s.

EXBIO Praha, a.s. nenese odpovědnost za porušení patentu ani za žádné další porušení práv duševního vlastnictví, ke kterým může dojít při používání těchto produktů. Objednávky na všechny produkty jsou přijímány v souladu s pravidly a podmínkami dostupnými na www.exbio.cz. EXBIO, EXBIO Logo a všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti EXBIO Praha, a.s.