Kit BasoFlowEx

Ref. ED7043

1. Objetivo previsto

Uso previsto

El Kit BasoFlowEx está destinado al examen por citometría de flujo **de las reacciones alérgicas mediadas por IgE** mediante el análisis de la exposición del antígeno CD63 en los basófilos en sangre humana entera heparinizada tras la estimulación con alérgenos. Para la estimulación se pueden utilizar alérgenos disponibles en el mercado.

Contexto de un estado fisiológico o patológico

El punto crucial en el diagnóstico de una alergia es determinar el alérgeno causante. La fiabilidad del método de prueba de punción cutánea (SPT), utilizado habitualmente, es baja y esta prueba puede favorecer la enfermedad alérgica del paciente. De ahí que sean aconsejables las pruebas *in vitro*, como la detección de IgE específica en suero (sIgE), o el análisis de marcadores de activación de basófilos. Aunque la especificidad de la detección de sIgE es suficiente para la mayoría de los alérgenos, el porcentaje de su sensibilidad suele ser sólo del 75. Además, en el caso de los alérgenos alimentarios y farmacológicos, tanto la sensibilidad como la especificidad de la detección de sIgE son mucho menores. Por el contrario, la prueba de activación de basófilos (BAT) muestra una especificidad muy alta y también una alta sensibilidad, incluyendo muchos alérgenos problemáticos.

2. Principio de prueba

El ensayo BAT se basa en la estimulación *in vitro* de los basófilos utilizando un alérgeno sensibilizante y el posterior análisis por citometría de flujo de la exposición al antígeno CD63 externalizado en la superficie de los basófilos tras la degranulación. Si hay una cantidad suficiente de moléculas de IgE alergeno-específicas unidas a los receptores Fcεde alta afinidad de la superficie celular del basófilo, las moléculas alergénicas reticulan los receptores, lo que provoca la activación completa del basófilo. Como consecuencia, los gránulos citoplasmáticos que contienen la proteína transmembrana CD63 se fusionan con la membrana plasmática y liberan mediadores inflamatorios. Por lo tanto, el antígeno CD63 se expone como un marcador de la activación de los basófilos (degranulación). El antígeno CD63 expuesto se detecta mediante tinción con anticuerpo monoclonal (clon MEM-259, marcado con FITC). La población de basófilos se identifica mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD203c (clon NP4D6, marcado con R-ficoeritrina (PE)). Se estimula una muestra de control positivo utilizando un anticuerpo monoclonal contra la molécula IgE que imita el proceso de entrecruzamiento alergénico de las moléculas IgE en la superficie de los basófilos y utilizando un péptido quimiotáctico N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP) que activa los basófilos a través del receptor fMLP (FPR1).

3. Reactivos suministrados

ED7043-1 **Tampón de estimulación** - 5 viales liofilizados, 1 vial sirve para la estimulación de 20 tubos.
ED7043-2 **Control de estimulación** - 2 viales liofilizados, 1 vial sirve para la estimulación de 25 controles positivos.
ED7043-3 **Reactivo de tinción** - 1 vial con 2 ml de cóctel de anticuerpos premezclados: anti-CD63, marcado con FITC + anti-CD203c, marcado con PE.
ED7043-4 **Solución de lisis**- 30 ml.

4. Materiales necesarios pero no suministrados

Alérgenos
Tubos de ensayo de 5 ml adecuados para la tinción de sangre
(por ejemplo, 12 × 75 mm)
Tampón PBS
Agua desmineralizada ultrapura

5. Equipamiento necesario

Pipetas automáticas con puntas desechables
Agitador vórtex
Termostato capaz de incubar tubos de ensayo a 37° C
Centrifugadora con rotor para tubos de ensayo
Citómetro de flujo - excitación láser azul a 488 nm, emisión de luz a 525 nm (FITC) y 575 nm (PE)

6. Almacenamiento y manipulación

Almacene el Kit BasoFlowEx a 2-8° C. Manténgalo alejado de la luz solar. La fecha de caducidad figura en las etiquetas de los viales y en la caja.
Véase la sección 9: "Procedimiento-Preparación del reactivo" para obtener información sobre la conservación de los reactivos reconstituidos y su estabilidad en uso.

7. Advertencias, precauciones y limitaciones de uso

- Destinado al diagnóstico in vitro en laboratorios fuera de los EE. UU. y Canadá.
- Este kit CE-IVD es conforme con la Directiva europea 98/79/CE.
- No utilice reactivos después de su fecha de caducidad.
- Evite la contaminación de los reactivos.
- Las muestras de sangre se consideran potencialmente infecciosas y deben manipularse con cuidado.
- Evite la exposición prolongada del reactivo de tinción (ED7043-3) a la luz.
- La solución de lisis (ED7043-4) contiene formaldehído y metanol.

  Frases H
  H302+H312+H332: Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación.
  H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
  H351: Se sospecha que provoca cáncer.

  Frases P
  P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización.
  P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
  P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal.
  P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
  P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
  P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una instalación autorizada para residuos peligrosos.

- Consulte la ficha de datos de seguridad del producto para obtener información completa sobre los peligros potenciales y cómo trabajar con el producto de forma segura.
- La muestra de sangre puede contener un número insuficiente de basófilos.
- Los basófilos de algunas muestras de sangre no son susceptibles de estimulación.
- La fiabilidad del ensayo depende de la calidad del alérgeno.
- El citómetro de flujo puede producir resultados falsos si el dispositivo no se ha realizado una alineación y mantenimiento correctos.
- Los datos se pueden interpretar incorrectamente si las señales fluorescentes no se compensaron correctamente o si las puertas se ajustaron de forma imprecisa.
- Las muestras tintadas deben analizarse dentro del plazo normalizado y, como máximo, 2 horas después de la lisis.
- El citómetro de flujo debe calibrarse de forma rutinaria utilizando microesferas fluorescentes para garantizar una sensibilidad estable de los detectores.
- Cualquier incumplimiento del procedimiento de ensayo puede producir resultados falsos.

8. Muestras

Utilice sangre humana entera heparinizada para el examen.
La sangre debe recogerse en un tubo que contenga heparina. Siga las instrucciones del fabricante del tubo para garantizar que se alcanza el volumen de llenado correcto.
Los anticoagulantes EDTA y citrato afectan negativamente a los resultados del análisis.
Las muestras de sangre deben conservarse a temperatura ambiente.
Las muestras de sangre deben tratarse en las 8 horas siguientes a su recogida si se conservan a temperatura ambiente.
Los aeroalérgenos (polen, ácaros, polvo) pueden contaminar los tubos abiertos en el laboratorio y provocar un aumento de la emisión de fondo.

9. Procedimiento

Preparación de los reactivos

1. Reconstituya el **tampón de estimulación** liofilizado con 2 ml de agua desmineralizada. Almacene el volumen no utilizado del tampón a 2-8° C un máximo de **5 días**. Alternativamente, el tampón se puede repartir en alícuotas, congelarse una vez y almacenarse a ≤-20° C para su uso posterior. Evite los ciclos repetidos de congelación/descongelación.
2. Reconstituya el **control de estimulación** liofilizado utilizando 0,25 ml de agua desmineralizada. Almacene el volumen no utilizado del reactivo a 2-8° C un máximo de **30 días**. Alternativamente, el reactivo se puede repartir en alícuotas, congelarse una vez y almacenarse a ≤-20° C para su uso posterior. Evite los ciclos repetidos de congelación/descongelación.
3. Los demás reactivos (**reactivo de tinción**, **solución de lisis**) están listos para su uso.

Procedimiento de examen

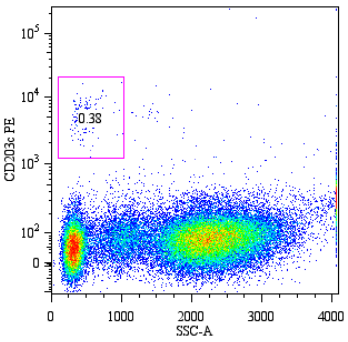
Para el examen de una muestra de sangre, prepare los tubos de ensayo para el **control negativo**, el **control positivo** y para las **muestras que se van a estimular con diferentes alérgenos**. Para la estimulación pueden utilizarse diversos alérgenos disponibles en el mercado. Prepare las muestras según el procedimiento siguiente.

1. Añada en el tubo de:
   - **muestra estimulada con alérgeno** - 10 µl de alérgeno,
   - **muestra de control negativo** - nada,
   - **muestra de control positivo** - 10 µl de control de estimulación o utilizar un tubo de alérgeno liofilizado (EXBIO).
2. Añada 100 µl de tampón de estimulación en todos los tubos.
3. Añada 100 µl de sangre entera heparinizada a todos los tubos y agite suavemente.
4. Incube los tubos a 37° C durante 15 minutos en baño de agua o 25 minutos en incubadora de aire.
5. Añada 20 µl de reactivo de tinción a todos los tubos, agite suavemente e incube durante 20 minutos a 2-8° C o en hielo.
6. Añada 300 µl de solución de lisis en todos los tubos, agite suavemente e incube durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Añada 3-4 ml de agua desmineralizada a todos los tubos, agite suavemente e incube durante 5-10 minutos a temperatura ambiente hasta que los eritrocitos estén lisados.
8. Centrifugue los tubos durante 5 minutos a 300x g.
9. Elimine el sobrenadante y resuspenda el pellet en 0,2-0,4 ml de tampón PBS.
10. Analice las muestras con un citómetro de flujo en las 2 horas siguientes a la tinción.

Análisis de los datos de la citometría de flujo

Analice las muestras tintadas utilizando un citómetro de flujo. Para analizar un número suficiente de basófilos (>200), adquiera 50 000-100 000 eventos por muestra. Compense sus datos (canales FITC y PE) antes o después de la adquisición.
Visualice los datos compensados en el gráfico de puntos de dispersión lateral (SSC) frente a la intensidad de fluorescencia en el canal PE (FL2). Configure la puerta para la población de basófilos (CD203c ^{positivo}, SSC ^{bajo}) como se muestra en la figura 1. La puerta debe ajustarse individualmente para cada muestra.

Fig. 1 Delimitación de la población de basófilos (CD203c^{positivo}/SSC^{bajo}).



A continuación, se representan los basófilos en un histograma que se muestra en las figuras 2a, b, c, donde el eje X representa la intensidad de fluorescencia en el canal FITC (FL1). Ajuste la puerta para los basófilos no estimulados (^{CD63dim}) utilizando la muestra de control negativo.

Fig. 2a Histograma de los basófilos estimulados por alérgenos.

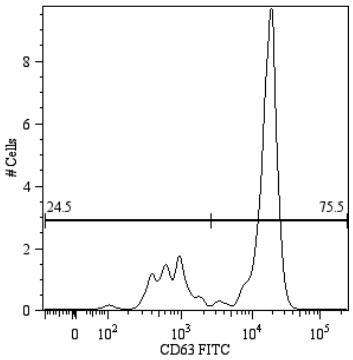


Fig. 2b Histograma de los basófilos de control negativo.

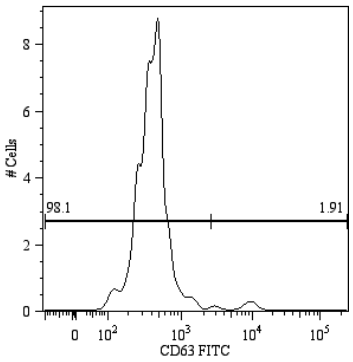
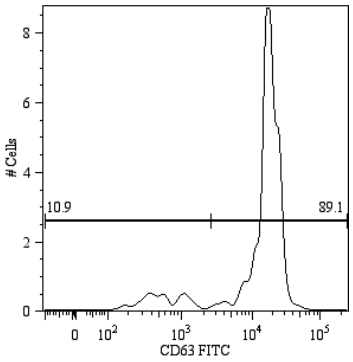


Fig. 2c Histograma de los basófilos de control positivo.



Cálculo e interpretación de los resultados analíticos

Calcule el porcentaje de basófilos activados (CD63^{brillante}) en las muestras estimuladas con alérgenos y en la muestra de control positivo.
Se considera que los individuos son alérgicos a los alérgenos probados cuando el porcentaje de basófilos activados supera el valor de corte. Los valores de corte recomendados para los grupos de alérgenos son los siguientes:

Inhalantes y alérgenos alimentarios	≥15 %
Venenos de himenópteros	≥10 %
Drogas	≥5 %

Si la muestra de control positivo muestra una activación de basófilos < 20 %, las muestras estimuladas con alérgenos no se pueden interpretar.

10. Rendimiento analítico

Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

La repetibilidad y reproducibilidad del ensayo se determinó a partir de los datos medidos por cinco operadores utilizando seis alérgenos sensibilizantes en dos paralelos sobre una muestra de sangre en las mismas condiciones experimentales. Mediante el análisis de la varianza se calcularon los siguientes parámetros:

^{Repetibilidad} CV = 2,4 %
Reproducibilidad ^{CV} = 3,4 %

11. Rendimiento clínico

Especificidad y sensibilidad

La especificidad y la sensibilidad del ensayo se determinaron comparando el kit BasoFlowEx con dos pruebas BAT de la competencia disponibles en el mercado. La comparación se llevó a cabo en un laboratorio clínico de rutina con 100 pruebas.

Parámetro	BasoFlowEx frente a la competencia A	BasoFlowEx frente a la competencia B	competencia B frente a la competencia A
Sensibilidad (%)	96,6	85,9	94,7
Especificidad (%)	82,9	79,3	69,2

Valores previstos

A continuación se indica el número medio de basófilos activados medido en 20 muestras de control positivo. En teoría, el número de basófilos activados en la muestra estimulada por alérgenos puede variar en un intervalo de 0-100 %.

Parámetro	Media (%)	SD	CV (%)
Basófilos activados	77,3	19,4	25,1

12. Referencias

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. Fabricante

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 50 Vestec
República Checa

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

14. Marcas registradas

n/a

15. Historial de revisiones

• Versión 1, ED7043_IFU_v1
Lanzamiento inicial
• Versión 2, ED7043_IFU_v2
Un cambio de texto en la sección Precauciones: se ha eliminado el texto "Destinado únicamente a uso profesional" y se ha sustituido por "Destinado al diagnóstico in vitro en laboratorios fuera de los EE. UU. y Canadá. Este kit CE-IVD es conforme con la Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro".
• Versión 3, ED7043_IFU_v3
El texto de la advertencia se cambió de "La solución de lisis (ED7043-4) contiene < 5 % de formaldehído" a "La solución de lisis (ED7043-4) contiene formaldehído y metanol".
Las frases R y S y el símbolo de peligro se han sustituido por las frases H y P y los símbolos del GHS de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008.
• Versión 4, ED7043_IFU_v4
Se ha eliminado el texto "por ejemplo, utilizado para pruebas de punción" de la sección Uso previsto.
Se ha suprimido el texto "(por ejemplo, para las pruebas de punción)" de la sección Material necesario no suministrado.
Se ha eliminado el texto "por ejemplo, prueba de punción con alérgenos en una dilución adecuada (1-10x)" de la sección Procedimiento de ensayo.
• Versión 5, ED7043_IFU_v5
El logotipo de la empresa ha cambiado.
El diseño de la IFU ha cambiado.
La frase "mantener alejado de la luz solar" se ha añadido a la sección Almacenamiento.
Se ha añadido el texto "Siga las instrucciones del fabricante del tubo para garantizar que se alcanza el volumen de llenado correcto" en la sección Muestras.
En la sección Almacenamiento y manipulación se ha añadido el texto "Véase la sección 9: "Procedimiento-Preparación del reactivo" para obtener información sobre el almacenamiento de los reactivos reconstituidos y su estabilidad en uso".
El código postal del fabricante ha cambiado de 25242 a 25250.
En la sección Advertencias, precauciones y limitaciones de uso se ha añadido el texto "Consulte la ficha de datos de seguridad del producto para obtener información completa sobre los peligros potenciales y cómo trabajar con el producto de forma segura".
• Versión 6, ED7043_IFU_v6
Se ha perfeccionado el texto sobre la limitación de uso del producto.

• Versión 7, ED7043_IFU_v7
En la sección Procedimiento de examen, se ha añadido la siguiente frase al punto 1: "o utilizar un tubo de alérgeno liofilizado (EXBIO)."

exbio

Kit BasoFlowEx

100 pruebas | N.º ref. ED7043

IVD CE

Instrucciones de uso

Versión ED7043_IFU_v7_ES
Fecha de emisión: 08-04-2024

Símbolos

REF	Número de catálogo
LOT	Código de lote
	Fecha de caducidad
	Límites de temperatura
	Mantener alejado de la luz solar
IVD	Productos sanitarios para diagnóstico in vitro
CE	Marcado CE de conformidad
	Consultar las instrucciones de uso
	Fabricante

El producto es adecuado para uso diagnóstico in vitro. Las aplicaciones diagnósticas o terapéuticas in vivo están estrictamente prohibidas.
Los productos no se utilizarán para su reventa o transferencia a terceros, ya sea como producto independiente o como componente de fabricación de otro producto, sin el consentimiento por escrito de EXBIO Praha, a.s.
EXBIO Praha, a.s. no se responsabiliza de la infracción de patentes o de cualquier otra violación de los derechos de la propiedad intelectual que pueda producirse con el uso de los productos. Los pedidos de todos los productos se aceptan sujetos a los Términos y condiciones disponibles en www.exbio.cz. EXBIO, el logotipo de EXBIO y todas las demás marcas comerciales son propiedad de EXBIO Praha, a.s.