

Kit BasoFlowEx

Réf. ED7043

1. Usage prévu

Utilisation prévue

Le kit BasoFlowEx est destiné à l'examen par cytométrie en flux des réactions allergiques à médiation par les IgE par le biais de l'analyse de l'exposition à l'antigène CD63 sur les basophiles dans le sang total hépariné humain lors d'une stimulation allergénique. Des allergènes disponibles dans le commerce peuvent être utilisés pour la stimulation.

Contexte d'un état physiologique ou pathologique

Lors du diagnostic des allergies, il est essentiel de déterminer l'allergène responsable. La fiabilité de la méthode couramment utilisée, à savoir le test cutané (SPT), est faible et ce test peut favoriser l'affection allergique du patient. C'est pourquoi des tests *in vitro*, tels que la détection d'IgE spécifiques dans le sérum (sIgE) ou l'analyse des marqueurs d'activation des basophiles, sont conseillés. Bien que la spécificité de la détection des sIgE soit suffisante pour la plupart des allergènes, sa sensibilité se situe généralement aux alentours de 75 % seulement. En outre, pour les allergènes alimentaires et médicamenteux, la sensibilité et la spécificité de la détection des sIgE sont nettement inférieures. En revanche, le test d'activation des basophiles (BAT) présente une spécificité très élevée ainsi qu'une sensibilité élevée, notamment pour de nombreux allergènes posant un problème.

2. Principe du test

Le test BAT repose sur la stimulation *in vitro* des basophiles à l'aide d'un allergène sensibilisant et sur l'analyse ultérieure par cytométrie en flux de l'exposition de l'antigène CD63 externalisé à la surface des basophiles après dégranulation. Si une quantité suffisante de molécules d'IgE spécifiques de l'allergène est liée aux récepteurs FcεR1 de haute affinité à la surface des cellules basophiles, les molécules d'allergène réticulent les récepteurs, entraînant l'activation complète des basophiles. En conséquence, les granules cytoplasmiques contenant la protéine transmembranaire CD63 fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent des médiateurs inflammatoires. Par conséquent, l'antigène CD63 est exposé en tant que marqueur de l'activation des basophiles (dégranulation). L'antigène CD63 exposé est détecté par la coloration de l'anticorps monoclonal (clone MEM-259, marqué FITC). La population de basophiles est identifiée par coloration à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD203c (clone NP4D6, marqué à la R-phycoérythrine (PE)). Un échantillon de contrôle positif est stimulé à l'aide d'un anticorps monoclonal contre la molécule d'IgE qui imite le processus de réticulation des molécules d'IgE à la surface des basophiles et à l'aide d'une peptide chimiotactique N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) qui active les basophiles par l'intermédiaire du récepteur fMLP (FPR1).

3. Réactifs fournis

ED7043-1 Tampon de stimulation - 5 flacons lyophilisés, 1 flacon est destiné à la stimulation de 20 tubes.

ED7043-2 Contrôle de stimulation - 2 flacons lyophilisés, 1 flacon est destiné à la stimulation de 25 contrôles positifs.

ED7043-3 Réactif de coloration - 1 flacon contenant 2 ml de cocktail d'anticorps prémélangé : anti-CD63, marqué FITC + anti-CD203c, marqué PE.

ED7043-4 Solution de lyse - 30 ml.

4. Matériel requis mais non fourni

Allergènes

Tubes à essai de 5 ml adaptés à la coloration du sang (par exemple 12 x 75 mm)

Tampon PBS

Eau déminéralisée ultra-pure

5. Équipement requis

Pipettes automatiques avec embouts jetables

Mélangeur de type vortex

Thermostat capable d'incuber des tubes à essai à 37 °C

Centrifugeuse avec rotor adaptée aux tubes à essai

Cytomètre en flux - excitation laser bleu à 488 nm, émission lumineuse à 525 nm (FITC) et 575 nm (PE)

6. Conservation et manipulation

Conserver le kit BasoFlowEx à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas exposer à la lumière du soleil. La date de péremption est indiquée sur les étiquettes des flacons et sur la boîte.

Voir la section 9, « Procédure - Préparation des réactifs » pour plus d'informations sur la

conservation des réactifs reconstitués et leur stabilité en cours d'utilisation.

7. Avertissements, précautions et limitations d'utilisation

- Destiné au diagnostic *in vitro* dans des laboratoires situés en dehors des États-Unis et du Canada.
- Ce kit CE-IVD est conforme à la directive européenne 98/79/CE.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
- Éviter la contamination des réactifs.
- Les échantillons de sang sont considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés avec précaution.
- Éviter l'exposition prolongée à la lumière du réactif de coloration (ED7043-3).
- La solution de lyse (ED7043-4) contient du formaldéhyde et du méthanol.

Mentions de danger

H302+H312+H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact avec la peau ou d'inhalation.
H317 : Peut provoquer une réaction allergique cutanée.
H351 : Susceptible de provoquer un cancer.

Mentions de précaution

P270 : Ne pas manger, boire ou fumer pendant l'utilisation de ce produit.
P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/des lunettes de protection/une protection du visage.
P301+P312 : EN CAS D'INGESTION : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.
P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer soigneusement à l'eau pendant plusieurs minutes. Retirer les lentilles de contact, le cas échéant et si c'est facile à faire. Poursuivre le rinçage.
P501 : Éliminer le contenu/récipient dans une installation autorisée pour l'élimination des déchets dangereux.

- Consulter la fiche de données de sécurité du produit pour obtenir des informations complètes sur les dangers potentiels et la manipulation en toute sécurité du produit.
- L'échantillon de sang peut contenir un nombre insuffisant de basophiles.
- Les basophiles présents dans certains échantillons de sang ne sont pas sensibles à la stimulation.
- La fiabilité du dosage dépend de la qualité de l'allergène.
- Le cytomètre en flux peut produire des résultats erronés si l'appareil n'a pas été aligné et entretenu correctement.
- Les données pourraient être mal interprétées si les signaux fluorescents n'ont pas été correctement compensés ou si les portes ont été réglées de manière imprécise.
- Les échantillons colorés doivent être analysés dans un délai standardisé, mais pas plus de 2 heures après la lyse.
- Le cytomètre en flux doit être étalonné régulièrement à l'aide de microbilles fluorescentes afin de garantir la stabilité de la sensibilité des détecteurs.
- Tout manquement à la procédure de dosage peut entraîner des résultats erronés.

8. Échantillon

Utiliser du sang total humain hépariné pour l'examen.

Le sang doit être prélevé dans un tube contenant de l'héparine. Suivre les instructions du fabricant du tube pour s'assurer que le volume de remplissage est correct. Les anticoagulants EDTA et citrate affectent négativement les résultats de l'analyse. Les échantillons de sang doivent être conservés à température ambiante.

Les échantillons de sang doivent être traités dans les 8 heures suivant le prélèvement s'ils sont conservés à température ambiante.

Les aéroallergènes (pollen, acariens, poussière) peuvent contaminer les tubes ouverts en laboratoire et provoquer une augmentation des réjets de fond.

9. Procédure

Préparation des réactifs

- Reconstituer le **tampon de stimulation** lyophilisé en utilisant 2 ml d'eau déminéralisée. Conserver le volume non utilisé du tampon à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 5 jours au maximum. Le tampon peut également être aliquoté, congelé une fois et conservé à ≤ -20 °C en vue de son utilisation ultérieure. Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation.
- Reconstituer le **contrôle de stimulation**

- lyophilisé en utilisant 0,25 ml d'eau déminéralisée. Conserver le volume non utilisé du réactif à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 30 jours au maximum. Le réactif peut également être aliquoté, congelé une fois et conservé à ≤ -20 °C en vue de son utilisation ultérieure. Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation.
- Les autres réactifs (**réactif de coloration**, **solution de lyse**) sont prêts à l'emploi.

Procédure d'examen

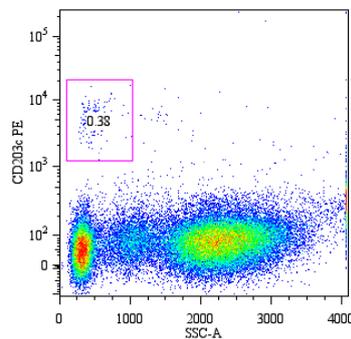
Pour l'examen d'un échantillon de sang, préparer les tubes à essai du **contrôle négatif**, du **contrôle positif** et des **échantillons à stimuler avec différents allergènes**. Divers allergènes disponibles dans le commerce peuvent être utilisés pour la stimulation. Préparer les échantillons selon la procédure suivante.

- Ajouter dans le tube de :
 - échantillon stimulé par un allergène - 10 µl d'allergène,
 - échantillon de contrôle négatif - rien,
 - échantillon de contrôle positif - 10 µl de contrôle de stimulation ou utiliser un tube d'allergène lyophilisé (EXBIO).
- Ajouter 100 µl de tampon de stimulation dans tous les tubes.
- Ajouter 100 µl de sang total hépariné dans tous les tubes et agiter au vortex délicatement.
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 15 minutes au bain-marie ou 25 minutes dans un incubateur à air.
- Ajouter 20 µl de réactif de coloration dans tous les tubes, agiter délicatement et incuber pendant 20 minutes à une température comprise entre 2 et 8 °C ou sur de la glace.
- Ajouter 300 µl de solution de lyse dans tous les tubes, agiter délicatement et incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 3-4 ml d'eau déminéralisée dans tous les tubes, mélanger délicatement au vortex et incuber pendant 5-10 minutes à température ambiante jusqu'à la lyse des globules rouges.
- Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 300x g.
- Retirer le surnageant et remettre en suspension le culot dans 0,2-0,4 ml de tampon PBS.
- Analyser les échantillons à l'aide d'un cytomètre en flux dans les 2 heures suivant la coloration.

Analyse cytométrique en flux

Analyser les échantillons colorés à l'aide d'un cytomètre en flux. Afin d'analyser un nombre suffisant de basophiles (> 200), acquérir 50 000 à 100 000 événements par échantillon. Compenser les données (canaux FITC et PE) avant ou après l'acquisition. Visualiser les données compensées sur la diffusion latérale (SSC) par rapport à l'intensité de fluorescence dans le tracé de points du canal PE (FL2). Régler la porte pour la population de basophiles (CD203c^{positive}, SSC^{low}) comme indiqué dans la figure 1. La porte doit être réglée individuellement pour chaque échantillon.

Fig. 1. Délimitation de la population de basophiles (CD203c^{pos}/SSC^{low}).



Tracer ensuite les basophiles marqués sous forme d'histogramme comme indiqué dans les figures 2a,b,c où l'axe X représente l'intensité de fluorescence dans le canal FITC (FL1). Régler la porte pour les basophiles non stimulés (CD63^{dim}) en utilisant l'échantillon de contrôle négatif.

Fig. 2a Histogramme des basophiles stimulés par des allergènes.

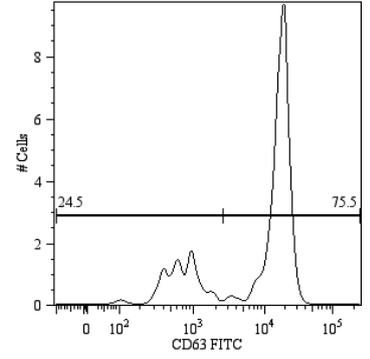


Fig. 2b Histogramme des basophiles du contrôle négatif.

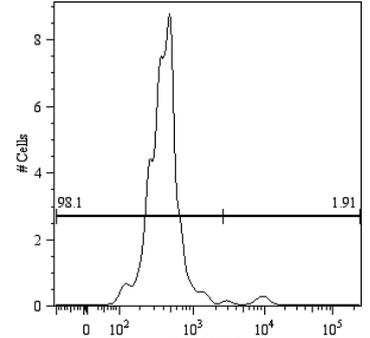
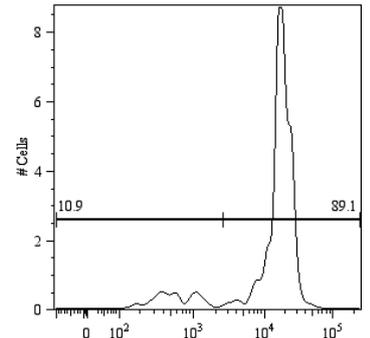


Fig. 2c Histogramme des basophiles du contrôle positif.



Calcul et interprétation des résultats de l'analyse

Calculer le pourcentage de basophiles activés (CD63^{bright}) dans les échantillons stimulés par l'allergène et dans l'échantillon de contrôle positif.

Les individus sont considérés comme allergiques aux allergènes testés lorsque le pourcentage de basophiles activés dépasse la valeur seuil. Les valeurs limites recommandées pour les groupes d'allergènes sont les suivantes :

Allergènes inhalés et alimentaires	≥15 %
Venins d'hyménoptères	≥10 %
Médicaments	≥5 %

Si l'échantillon de contrôle positif présente une activation des basophiles < 20 %, les échantillons stimulés par les allergènes ne peuvent pas être interprétés.

10. Performances analytiques

Précision (répétabilité et reproductibilité)

La répétabilité et la reproductibilité du test ont été déterminées à partir des données mesurées par cinq opérateurs utilisant six allergènes sensibilisants en deux parallèles sur un échantillon de sang dans les mêmes conditions expérimentales. L'analyse de la variance a permis de calculer les paramètres suivants :

Répétabilité CV	= 2,4 %
Reproductibilité CV	= 3,4 %

11. Performances cliniques

Spécificité et sensibilité

La spécificité et la sensibilité du dosage ont été déterminées en comparant le kit BasoFlowEx à deux tests BAT concurrents disponibles sur le marché. La comparaison a été effectuée dans un laboratoire clinique de routine sur 100 tests.

Paramètres	BasoFlowEx contre Comp. A	BasoFlowEx contre Comp. B	Comp. B contre Comp. A
Sensibilité (%)	96,6	85,9	94,7
Spécificité (%)	82,9	79,3	69,2

Valeurs attendues

Le nombre moyen de basophiles activés mesuré dans 20 échantillons de contrôle positif est indiqué ci-dessous. En théorie, le nombre de basophiles activés dans un échantillon stimulé par un allergène peut varier de 0 à 100 %.

Paramètres	Moyenne (%)	É-T	CV (%)
Basophiles activés	77,3	19,4	25,1

12. Références

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. Fabricant

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 50 Vestec
République tchèque

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

14. Marques commerciales

s/o

15. Historique des révisions

- Version 1, ED7043_IFU_v1
Première version
- Version 2, ED7043_IFU_v2
Suppression du texte « Destiné à un usage professionnel uniquement » et remplacement par « Destiné à une utilisation diagnostique in vitro dans des laboratoires en dehors des États-Unis et du Canada. Ce kit CE-IVD est conforme à la directive européenne 98/79/CE sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro ».
- Version 3, ED7043_IFU_v3
Modification du texte de l'avertissement « La solution de lyse (ED7043-4) contient < 5 % de formaldéhyde » et remplacement par « La solution de lyse (ED7043-4) contient du formaldéhyde et du méthanol ».
Remplacement des mentions relatives aux risques et aux substances, ainsi que du symbole de danger, par des mentions de danger et de précautions et des symboles SGH conformément au règlement (CE) n° 1272/2008.
- Version 4, ED7043_IFU_v4
Suppression du texte « par exemple, utilisé pour les prick-tests » dans la section Utilisation prévue.
Suppression du texte « (par exemple pour les prick-tests) » dans la section Matériel requis mais non fourni.
Suppression du texte « par exemple, allergènes par prick-test à une dilution appropriée (1-10x) » dans la section Procédure de dosage.
- Version 5, ED7043_IFU_v5
Modification du logo de l'entreprise.
Modification de la mise en page du mode d'emploi.
Ajout de la mention « Ne pas exposer à la lumière du soleil » a été ajoutée à la section Conservation.

Ajout du texte « Suivre les instructions du fabricant du tube pour s'assurer que le volume de remplissage est correct » à la section Échantillon.

Ajout du texte « Voir la section 9, « Procédure - Préparation des réactifs » pour plus d'informations sur la conservation des réactifs reconstitués et leur stabilité en cours d'utilisation » à la section Conservation et manipulation.

Remplacement du code postal du fabricant 25242 par 25250.

Ajout du texte « Consulter la fiche de données de sécurité du produit pour obtenir des informations complètes sur les dangers potentiels et la manipulation en toute sécurité du produit » à la section Avertissements, précautions et limitations d'utilisation.

• Version 6, ED7043_IFU_v6

Ajout de précisions au texte sur les limitations d'utilisation du produit.

• Version 7, ED7043_IFU_v7

Dans la section Procédure d'examen, la phrase suivante a été ajoutée au point 1 : « ou utiliser un tube d'allergène lyophilisé (EXBIO) ».

exbio

Kit BasoFlowEx

100 tests | Réf. cat. ED7043



Mode d'emploi

Version ED7043_IFU_v7_FR

Date de publication : 08-04-2024

Symboles

- Référence catalogue
- Code du lot
- Date limite d'utilisation
- Limites de température
- Tenir à l'écart de la lumière du soleil
- Dispositif médical de diagnostic in vitro
- Marquage CE de conformité
- Consulter le mode d'emploi
- Fabricant

Le produit est destiné à un usage diagnostique in vitro. Les applications diagnostiques ou thérapeutiques in vivo sont strictement interdites.

Les produits ne peuvent pas être revendus ni transférés à des tiers, que ce soit en tant que produit autonome ou en tant que composant entrant dans la fabrication d'un autre produit sans le consentement par écrit d'EXBIO Praha, a.s.

EXBIO Praha, a.s. décline toute responsabilité en cas de contrefaçon de brevet ou de toute autre violation des droits de propriété intellectuelle pouvant survenir lors de l'utilisation des produits. Les commandes de tous les produits sont acceptées sous réserve des conditions générales disponibles sur www.exbio.cz. EXBIO, le logo EXBIO et toutes les autres marques commerciales sont la propriété d'EXBIO Praha, a.s.