

# BasoFlowEx Kit

Cat.No. ED7043

## 1. Propósito pretendido

### Utilização pretendida

O BasoFlowEx Kit destina-se ao estudo de IGE por citometria de fluxo mediante reações alérgicas, analisando a exposição ao antígeno CD63 nos basófilos, em sangue total humano heparinizado, após estimulação com alérgenos, comercialmente disponíveis.

### Contexto de um estado fisiológico ou patológico

O ponto importante no diagnóstico de alergia é determinar o alérgeno causador. A confiabilidade do método comumente utilizado do teste cutâneo em picada (SPT) é baixa, podendo promover a doença alérgica do paciente. Portanto, são recomendados, testes *in vitro*, como a detecção de IgE no soro (sIgE), ou análise de marcadores de ativação de basófilos. Embora a especificidade de detecção de sIgE seja suficiente para a maioria dos alérgenos, a sua sensibilidade é, geralmente, cerca de 75%. Além disso, para alérgenos alimentares e medicamentosos, a sensibilidade e especificidade da detecção de sIgE são mais baixas. Em comparação, o teste de ativação de basófilos (BAT) apresenta uma especificidade muito alta, bem como uma alta sensibilidade, incluindo muitos alérgenos problemáticos.

## 2. Princípio do Teste

O teste BAT baseia-se na estimulação *in vitro* de basófilos, utilizando o alérgeno de sensibilização e subsequente análise de citometria de fluxo da exposição do antígeno CD63 externalizado na superfície do basófilo após a desgranulação. Se existir quantidade suficiente de moléculas de IgE específicas do alérgeno e ligadas aos receptores FcεR1 de alta afinidade da superfície da célula basófila, as moléculas do alérgeno reticulam os receptores levando à ativação completa do basófilo. Como consequência, os grânulos citoplasmáticos que contêm a proteína transmembranar CD63 unem-se à membrana plasmática e libertam mediadores inflamatórios. Portanto, o antígeno CD63 é exposto como um marcador de ativação de basófilos (desgranulação). O antígeno CD63 exposto é detectado por coloração com anticorpo monoclonal (clone MEM-259, FITC). A população de basófilos é identificada por coloração utilizando anticorpo monoclonal anti-CD203c (clone NP4D6, marcado com R-phycoerythrin (PE)). Uma amostra de controlo positivo é estimulada utilizando um anticorpo monoclonal contra a molécula de IgE que imita o processo de reticulação de alérgenos de moléculas de IgE na superfície do basófilo e utilizando um péptido quimiotático N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) que ativa basófilos através do recetor fMLP (FPR1).

## 3. Reagentes fornecidos

**ED7043-1 Stimulation Buffer** – 5 tubos liofilizados, 1 é utilizado na estimulação de 20 tubos.

**ED7043-2 Stimulation Control** – 2 tubos liofilizados, 1 tubo é utilizado na estimulação de 25 controlos positivos.

**ED7043-3 Staining Reagent** – 1 tubo com 2 ml de um cocktail de anticorpos misturados: anti-CD63, FITC + anti-CD203c, PE.

**ED7043-4 Lysing Solution** – 30 ml.

## 4. Materiais necessários mas não fornecidos

Alérgenos  
Tubos de ensaio de 5ml para coloração de sangue (e.g. 12 x 75 mm)  
Tampão PBS  
Água desmineralizada ultrapura

## 5. Equipamento necessário

Pipetas automáticas com pontas descartáveis  
Vortex  
Termóstato para incubar tubos de ensaio a 37 °C  
Centrifugadora com rotor adequado aos tubos de ensaio  
Citometro de Fluxo – excitação de laser azul a 488 nm, emissão de luz a 525 nm (FITC) e 575 nm (PE)

## 6. Armazenamento e manipulação

Armazenar o kit BasoFlowEx Kit a 2-8 °C.  
Manter longe da luz solar. A data de validade está indicada nos rótulos dos frascos e caixa do Kit.  
Consultar a seção 9, "Procedimento-Preparação do Reagente" para obter mais informação sobre armazenamento de reagentes reconstituídos e a sua estabilidade ao utilizá-los.

## 7. Avisos, precauções e limitações de utilização

- Para utilização de Diagnóstico *In Vitro* em laboratórios fora dos EUA e Canadá.
- Este kit CE-IVD está em conformidade com a Diretiva Europeia 98/79/EC.
- Não utilizar reagentes após o prazo de validade expirado.
- Evitar a contaminação de reagentes.
- As amostras de sangue são consideradas potencialmente infecciosas e devem ser manipuladas com o devido cuidado.
- Evitar a exposição prolongada do Reagente (ED7043-3) à luz.
- A Solução de Lise (ED7043-4) contém formol e metanol.

### Frases-H

H302+H312+H332: Nocivo por ingestão, em contacto com a pele ou inalação.  
H317: Pode causar reação alérgica na pele.  
H351: Suspeito de causar tumor.

### Frases-P

P270: Não comer, beber ou fumar, durante a utilização deste produto.  
P280: Usar luvas / roupa de proteção / óculos de proteção / proteção facial.  
P301+P312: EM CASO DE INGESTÃO: Contactar o CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico caso não se sintam bem.  
P302+P352: EM CASO DE CONTACTO COM A PELE: Lavar abundantemente com água e sabão.  
P305+P351+P338: EM CASO DE CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar com água durante alguns minutos. Remover as lentes de contacto se existirem. Continuar enxaguando.

P501: Descartar o conteúdo/recipiente em contentor autorizado para resíduos perigosos.

- Consultar a folha de Dados de Segurança do produto para obter informações completas sobre os potenciais perigos e como trabalhar com segurança com o produto.
- A amostra de sangue pode conter número insuficiente de basófilos.
- Os basófilos em algumas amostras de sangue não são suscetíveis à estimulação.
- A confiabilidade do ensaio depende da qualidade do alérgeno.
- O Citometro de Fluxo pode produzir resultados falsos se o dispositivo não for alinhado e mantido de forma adequada.
- Os resultados podem ser interpretados de forma incorreta se os sinais fluorescentes não forem compensados corretamente ou se os *gates* forem configurados incorretamente.
- As amostras coradas devem ser analisadas dentro do período de tempo padronizado, mas não mais de 2 horas após a lise.
- O Citometro de Fluxo deve ser calibrado por rotina, utilizando microesferas fluorescentes para garantir a sensibilidade estável dos detetores.
- Qualquer não execução do procedimento do ensaio pode originar resultados falsos.

## 8. Amostra

Utilizar sangue total humano heparinizado para exame.

O sangue deve ser colocado num tubo que contenha heparina. Seguir as instruções do fabricante para garantir que o volume de amostra será o correto.

Os anticoagulantes EDTA e Citrato afetam negativamente os resultados da análise.

As amostras de sangue devem ser armazenadas em temperatura ambiente.

As amostras de sangue devem ser tratadas dentro de 8 horas após colheita, quando armazenadas à TA.

Aeroalérgenos (pólen, ácaros, poeira) podem contaminar os tubos abertos e causar aumento da liberação de fundo.

## 9. Procedimento

### Preparação de reagentes

- Reconstituir o **Stimulation Buffer** liofilizado usando 2 ml de água desmineralizada. Armazenar o volume de tampão não utilizado a 2-8 °C por 5 dias. Alternativamente, o tampão pode ser alíquotado, congelado uma vez e armazenado a ≤ -20 °C para uso posterior. Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.
- Reconstituir o **Stimulation Control** liofilizado usando 0,25 ml de água desmineralizada. Armazenar o volume de reagente a 2-8 °C por 30 dias. Alternativamente, o tampão pode ser alíquotado, congelado uma vez e armazenado a ≤ -20 °C para uso posterior. Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.
- Outros reagentes (**Staining Reagent**, **Lysing Solution**) estão prontos a usar.

## Procedimento do exame

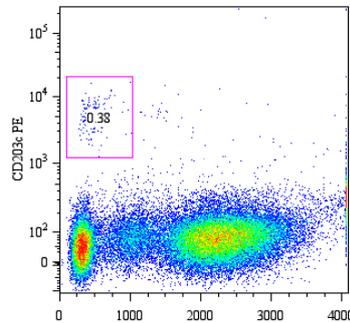
Para a realização de um teste de uma amostra de sangue, preparar os tubos de ensaio para o controlo negativo, controlo positivo e para amostras estimuladas com diferentes alérgenos. Vários tipos de alérgenos comercializados podem ser utilizados na estimulação. Preparar as amostras de acordo com o seguinte procedimento:

- Adicionar no tubo de:
  - alérgeno-amostra estimulada - 10 µl do alérgeno,
  - controlo negativo – não adicionar nada,
  - controlo positivo - 10 µl de Controlo Estimulante ou utilizar um tubo de alérgeno liofilizado (EXBIO).
- Adicionar 100 µl de **Stimulation Buffer** a todos os tubos.
- Adicionar 100 µl de sangue total heparinizado a todos os tubos e agitar suavemente no vortex.
- Incubar os tubos a 37 °C por 15 minutos em banho-maria ou 25 minutos na estufa.
- Adicionar 20 µl de **Staining Reagent** a todos os tubos, agitar no vortex suavemente, e incubar 20 minutos a 2-8 °C ou em gelo.
- Adicionar 300 µl de **Lysing Solution** a todos os tubos, agitar no vortex suavemente, e incubar 5 minutos à TA.
- Adicionar 3-4 ml de água desmineralizada a todos os tubos, agitar no vortex suavemente, e incubar 5-10 minutos à TA, até à lise dos glóbulos vermelhos.
- Centrifugar os tubos por 5 minutos a 300x g.
- Remover o sobrenadante e resuspende o pellet em 0,2-0,4 ml de Tampão PBS.
- Analisar as amostras utilizando o Citometro de Fluxo, dentro de 2 horas após o processamento.

### Análise de Citometria de Fluxo

Análise as amostras coradas usando o citometro de fluxo. Para analisar um número suficiente de basófilos (>200), adquira 50,000-100,000 eventos por amostra. Compensar os dados (canais FITC e PE) antes ou depois da aquisição. Visualizar dados compensados no *side-scatter* (SSC) versus intensidade de fluorescência no canal PE (FL2) no gráfico. Definir o *gate* para a população de basófilos (CD203c<sup>positivo</sup>, SSC<sup>low</sup>) como mostra a figura 1. O *gate* deve ser definido individualmente para cada amostra.

Fig. 1 Delimitação da população de basófilos (CD203c<sup>pos</sup> / SSC<sup>low</sup>).



Em seguida, fazer um *gate* nos basófilos como um histograma mostrado nas figuras 2a,b,c onde o eixo X representa a intensidade de fluorescência no canal FITC (FL1). Fazer um *gate* nos basófilos não-estimulados (CD63<sup>dim</sup>) utilizando um controlo negativo.

Fig. 2a Histograma de basófilos de alérgeno-estimulado.

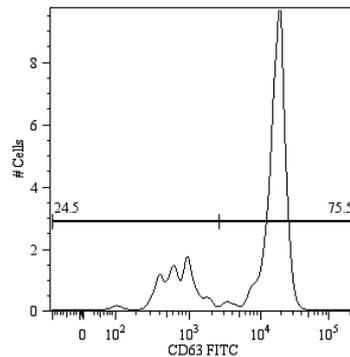


Fig. 2b Histograma de basófilos de controlo negativo.

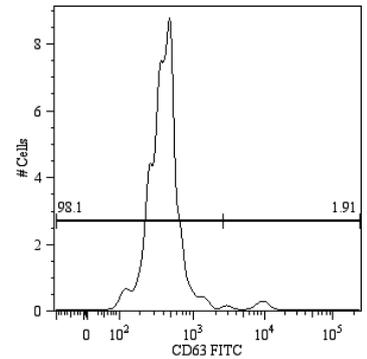
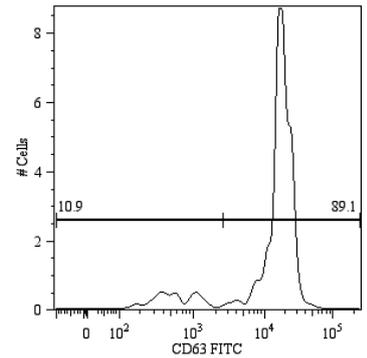


Fig. 2c Histograma de basófilos de controlo positivo.



## Cálculo e Interpretação dos resultados analíticos

Calcular a percentagem de basófilos ativados (CD63<sup>brigh</sup>) nas amostras estimuladas por alérgenos e na amostra de controlo positivo. Os indivíduos são considerados alérgicos aos alérgenos testados quando a percentagem de basófilos ativados ultrapassa os valores de *cut-off*. Os valores de *cut-off* são:

Alérgenos alimentares e de inalação	≥15 %
Venenos de Himenópteros	≥10 %
Drogas	≥5 %

Se a amostra de controlo positivo apresentar ativação de basófilo a < 20 %, as amostras estimuladas por alérgenos não podem ser interpretadas.

## 10. Desempenho Analítico

### Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)

A repetibilidade e reprodutibilidade do ensaio foram determinadas a partir de dados medidos por 5 especialistas utilizando 6 alérgenos sensibilizantes em paralelo numa amostra de sangue nas mesmas condições experimentais. Usando a Análise de variância, foram calculados os seguintes parâmetros:

CV <sup>repetibilidade</sup>	= 2.4 %
CV <sup>reprodutibilidade</sup>	= 3.4 %

## 11. Desempenho Clínico

### Especificidade e Sensibilidade

A especificidade e sensibilidade do ensaio foram determinadas em comparação do Kit BasoFlowEx Kit com dois testes BAT concorrentes disponíveis no mercado. Esta comparação foi realizada em Laboratório clínico de rotina em 100 testes.

Parâmetros	BasoFlowEx vs. Comp. A	BasoFlowEx vs. Comp. B	Comp. B vs. Comp. A
Sensibilidade (%)	96.6	85.9	94.7
Especificidade (%)	82.9	79.3	69.2

### Valores esperados

O número médio de basófilos ativados medidos em 20 amostras de controlo positivo está descrito embaixo. Em teoria, o número de basófilos ativados numa amostra estimulada por alérgeno pode variar num intervalo de 0-100 %.

Parâmetro	Mean (%)	SD	CV (%)
Actividade de basófilos	77.3	19.4	25.1

## 12. Bibliografia

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  
Czech Republic

[info@exbio.cz](mailto:info@exbio.cz)  
[technical@exbio.cz](mailto:technical@exbio.cz)  
[orders@exbio.cz](mailto:orders@exbio.cz)  
[www.exbio.cz](http://www.exbio.cz)

## 14. Marcas Registradas

n/a

## 15. Histórico de Revisão

- Versão 1, ED7043\_IFU\_v1  
Lançamento inicial
- Versão 2, ED7043\_IFU\_v2  
Uma alteração de texto na seção Precauções: O texto " Destinado apenas para uso profissional" foi removido e substituído por "Para utilização de Diagnóstico In Vitro em laboratórios fora dos EUA e Canadá. Este kit CE-IVD está em conformidade com a Diretiva Europeia 98/79/EC."
- Versão 3, ED7043\_IFU\_v3  
O texto de Aviso foi modificado para "A Solução de Lise (ED7043-4) contém < 5 % de formol" para "A Solução de Lise (ED7043-4) contém formol e metanol".  
R- e S-frases e o símbolo de perigo foram alterados para H- e P-frases e símbolos GHS de acordo com o Regulamento (EC) N° 1272/2008.
- Versão 4, ED7043\_IFU\_v4  
Texto "por exemplo usado para testes de picada" foi removido da seção Utilização Pretendida.  
Texto "(por exemplo, para testes de picada)" foi removido da seção Material necessário mas não fornecido.  
Texto "por exemplo, alérgenos do teste de picada em diluição adequada (1-10x)" foi removido da seção de procedimento do teste.
- Versão 5, ED7043\_IFU\_v5  
O logótipo da empresa foi alterado.  
Layout da IFU alterado.  
A frase "manter longe da luz solar" foi adicionada à seção Armazenamento.  
O texto "Seguir as instruções do fabricante do tubo para garantir que o volume da amostra é o correto" foi adicionado à seção Especificações.  
O texto "Consultar seção 9, "Procedimento-Preparação de Reagentes" para obter informação sobre armazenamento de reagents reconstituídos e sua estabilidade durante a utilização." Foi adicionado à seção Armazenamento e Manipulação.  
O Código postal do fabricante mudou de 25242 para 25250.  
O texto "Consultar a ficha de Dados de Segurança do produto para obter informações completas sobre potenciais perigos e como trabalhar em segurança com o produto" foi adicionado à seção Avisos, precauções e limites de utilização.
- Versão 6, ED7043\_IFU\_v6  
O texto "Limitação de Uso do Produto" foi alterado.
- Versão 7, ED7043\_IFU\_v7  
Na seção Procedimento do exame, foi acrescentada a seguinte frase ao ponto 1: "ou utilizar um tubo de alérgénio liofilizado (EXBIO)".

# exbio

## BasoFlowEx Kit

100 testes | Cat.No. ED7043



### Instruções de Utilização

Versão ED7043\_IFU\_v7\_PT  
Date de emissão: 08-04-2024

PT

### Símbolos

	Número de Catálogo
	Código de Lote
	Data de validade
	Limite de Temperatura
	Manter longe da luz solar
	Dispositivo medico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Marcação CE de conformidade
	Consultar instruções de utilização
	Fabricante

O produto foi desenvolvido para utilização em diagnóstico *in vitro*. Aplicações diagnósticas ou terapêuticas *in vivo* são estritamente proibidas.  
Os produtos não devem ser utilizados para revenda ou transferência a terceiros, seja como produto autônomo ou como componente de fabricação de outro produto sem o consentimento, por escrito, da EXBIO Praha, a.s..  
EXBIO Praha, a.s., não se responsabiliza por violação de patente ou qualquer outra violação de direitos de propriedade intelectual que possa ocorrer com a utilização dos produtos.  
Os pedidos de todos os produtos são aceites de acordo com os Termos de Condições disponíveis em [www.exbio.cz](http://www.exbio.cz).  
EXBIO, o logótipo EXBIO, e todas outras marcas comerciais são propriedade da EXBIO Praha, a.s..