

BasoFlowEx Kit

Kat.č. ED7043

1. Účel určenia pomôcky

Účel použitia

BasoFlowEx Kit je určený na testovanie alergickej reakcie sprostredkovanej protilátkami IgE analýzou expozície proteínu CD63 na povrchu bazofilov po ich stimulácii alergénom v ľudskej periférnej krvi s heparínom pomocou prietokovej cytometrie. Bazofily je možné stimulovať pomocou komerčne dostupných alergénov.

Súvislosť s fyziologickým alebo patologickým stavom

Kľúčovým bodom pri diagnostikovaní alergií je čo najpresnejšie stanovenie príčinného alergénu. Bežne používaná metóda kožných testov (SPT) sa vyznačuje nízkou spoľahlivosťou, a okrem toho môže u pacienta vyvolať zhoršenie stavu alergického ochorenia. Preto je dôležité využívať možnosť testovania *in vitro*, ako je detekcia špecifických protilátok IgE v sére (sIgE), či analýza aktivačných markerov bazofilov. Špecifickosť stanovenia sIgE je v prípade väčšiny alergénov dostatočne vysoká, ale senzitivita býva zväčša iba okolo 75%, okrem toho u niektorých alergénov (hlavne u potravín a liekov) je senzitivita i špecifickosť detekcie sIgE podstatne nižšia. Oproti tomu test aktivácie bazofilov (BAT) sa vyznačuje nielen veľmi vysokou špecifickosťou, ale aj vysokou senzitivitou, a to aj v prípade množstva problematických antigénov.

2. Princíp testovania

Princípom testu je vyvolanie aktivácie bazofilov *in vitro* v prítomnosti senzibilizujúceho alergénu a následné meranie expozície aktivačného znaku bazofilov (proteínu CD63) na bunečnom povrchu pomocou monoklonálnej protilátky metódou prietokovej cytometrie. V prípade, že je vo vzorke krvi prítomné dostatočné množstvo alergén-špecifických molekúl IgE, ktoré sú naviazané na povrchu bazofilov prostredníctvom vysokoafinitného receptora FcγRI, spôsobí pridaný alergén premostenie receptorov, ktoré vedie k plnej aktivácii bazofilov spojenej s procesom vyliatia obsahu zápalových mediátorov z cytoplazmatických granúl vnútri bunky (degranulácii). Degranulácia má okrem iného za následok aj expozíciu transmembránového proteínu cytoplazmatických granúl CD63 na povrchu bazofilov. Ten je následne detekovaný monoklonálnou protilátkou anti-CD63 (klon MEM-259) konjugovanou s FITC. Populácia bazofilov je v zmesi leukocytov identifikovaná monoklonálnou protilátkou anti-CD203c (klon NP4D6) konjugovanou s PE. Pozitívnu kontrolu predstavuje vzorka, v ktorej sú bazofily aktivované monoklonálnou protilátkou anti-IgE, ktorá zastupuje stimulačný účinok špecifického alergénu, a chemotaktickým peptidom N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), ktorý aktivuje bazofily cez fMLP receptor (FPR1).

3. Poskytované materiály

ED7043-1 Stimulation Buffer – 5 kusov fľaštičiek obsahujúcich lyofilizovaný stimulačný roztok, jedna fľaštička je určená na stimuláciu 20 skúmaviek.

ED7043-2 Stimulation Control – 2 kusy fľaštičiek obsahujúcich lyofilizovaný stimulans pozitívnej kontroly, jedna fľaštička je určená na stimuláciu 25 pozitívnych kontrolných vzoriek.

ED7043-3 Staining Reagent – 1 fľaštička obsahujúca 2 ml koktailu protilátok: anti-CD63 označená FITC + anti-CD203c označená PE.

ED7043-4 Lysing Solution – fľaštička s lyzačným roztokom, 30 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

Alergény
5ml skúmavky pre značenie buniek (12 × 75 mm)
Fosfatový tmivý roztok (PBS)
Ultracista demineralizovaná voda

5. Požadované zariadenia

Sada automatických pipiet s jednorázovými špičkami
Vortex
Termostat umožňujúci inkubovať skúmavky pri 37 °C
Centrifúga s rotorom pre skúmavky
Prietokový cytometer - excitácia modrým laserom 488 nm, emisia žiarenia pri 525 nm (FITC) a pri 575 nm (PE)

6. Skladovanie a zaobchádzanie

BasoFlowEx Kit skladujte pri teplote 2-8 °C. Súpravu je nutné chrániť pred slnečným žiarením. Doba použiteľnosti je vyznačená na jednotlivých reagentiách a na krabici súpravy. Informácie o skladovaní rekonštituovaných reagentií sú uvedené v oddieli 9.

7. Upozornenia, preventívne opatrenia

a obmedzenia

- Súprava je určená pre *In vitro* diagnostiku a vyhovuje požiadavkám európskej smernice pre *In vitro* diagnostické zdravotnícké prostriedky 98/79/EC.
- Nepoužívajte reagentie po uplynutí doby použiteľnosti.
- Chráňte obsah fľaštičiek zo súpravy pred kontamináciou.
- Vzorky krvi sú považované za potenciálne infekčný materiál, pracujte výhradne v ochranných rukaviciach a pri práci dodržujte správne postupy zaobchádzania s potenciálne infekčným materiálom.
- Staining Reagent (ED7043-3) nevystavujte dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Reagencia Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje formaldehyd a metanol.

H-vety

H302+H312+H332: Zdraviu škodlivý pri požití, pri kontakte s pokožkou a pri vdychnutí.
H317: Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
H351: Podozrenie na vyvolanie rakoviny.

P-vety

- P270: Pri používaní výrobku nejedzte, nepite ani nefajčite.
P280: Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
P301+312: PO POŽITÍ: Pri zdravotných problémoch volajte Národné toxikologické informačné centrum alebo lekára.
P302+352: PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla.
P305+351+338: PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.
P501: Zneškodnite obsah/nádobu v autorizovanom mieste zberu nebezpečných odpadov.

- Úplné informácie o potenciálnych nebezpečenstvách a bezpečnom spôsobe práce s výrobkom nájdete v bezpečnostnom liste produktu.
- Vzorka krvi môže obsahovať nedostatočné množstvo bazofilov pre vykonanie testu.
- Niektoré vzorky krvi môžu obsahovať bazofily, ktoré nie sú stimulovateľné.
- Kvalita použitého stimulačného alergénu ovplyvňuje spoľahlivé vykonanie testu.
- Prietokový cytometer môže poskytovať zlé hodnoty, pokiaľ nie je pravidelne kalibrovaný a udržiavaný.
- Ak nie sú fluorescenčné signály správne kompenzované alebo nie sú správne umiestnené regióny (gate) pre pozitívne a negatívne bunky, potom môžu byť dáta nesprávne interpretované.
- Vzorky analyzujte najneskôr do 2 hodín od znečistenia.
- Prietokový cytometer pravidelne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľčiek, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.
- Nedodržanie postupu merania môže ovplyvniť výsledky testov.

8. Vzorka

Výšetrenie sa vykonáva na krvi odobratej do skúmavky s heparínom.
Krv musí byť odobratá do skúmavky s heparínom. Postupujte podľa pokynov výrobcu skúmavky a uistite sa, že je dosiahnuté správneho plniaceho objemu krvi.
Antikoagulanty EDTA a citrát rušia stanovenie. Vzorky krvi skladujte pri laboratórnej teplote. Vzorky krvi spracujte najneskôr do 8 hodín po odbere za predpokladu, že sú skladované za laboratórnej teploty. Počas farbenia vzoriek chráňte obsah skúmaviek pred kontamináciou vzdušnými alergénmi (pele, prachové častice), ktoré môžu falošne zvýšiť počet aktivovaných bazofilov.

9. Postup

Príprava reagentí

- Lyofilizovaný stimulačný roztok (**Stimulation Buffer**) pred použitím rozpustite pomocou 2 ml demineralizovanej vody. Nevyužite množstvo stimulačného roztoku je možné skladovať v chladničke (2-8 °C) po dobu **5 dní**, popri prípade zamraziť pri ≤ -20 °C v alikvotných množstvách na ďalšie použitie. Vyvarujte sa opakovanému zamrazovaniu a rozmrazovaniu roztoku.
- Lyofilizovaný stimulans pozitívnej kontroly (**Stimulation Control**) pred použitím rozpustite pomocou 0,25 ml demineralizovanej vody. Nevyužite množstvo stimulans je možné skladovať v chladničke (2-8 °C) po dobu **30 dní**, popri prípade zamraziť pri ≤ -20 °C v alikvotných množstvách na ďalšie použitie. Vyvarujte sa opakovanému zamrazovaniu a rozmrazovaniu roztoku.
- Všetky ďalšie reagentie (**Staining Reagent, Lysing Solution**) sú pripravené na okamžité

použitie.

Priebeh analýzy

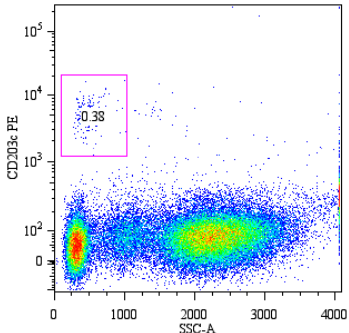
Na výšetrenie jednej vzorky krvi je nutné pripraviť **negatívnu kontrolu, pozitívnu kontrolu a potrebný počet skúmaviek stimulovaných testovanými alergénmi**. Na stimuláciu je možné použiť rôzne komerčné alergény. Vzorky pripravte podľa nasledujúceho postupu:

- Do skúmaviek určených pre:
 - vzorku stimulovanú alergénom** napipetujte 10 µl alergénu,
 - negatívnu kontrolnú vzorku** nepipetujte nič,
 - pozitívnu kontrolnú vzorku** napipetujte 10 µl rozpusteného stimulans (Stimulation Control) alebo použite jednu skúmavku s lyofilizovaným stimulačným roztokom (EXBIO).
- Do všetkých skúmaviek napipetujte 100 µl rozpusteného stimulačného roztoku (Stimulation Buffer).
- Do všetkých skúmaviek napipetujte 100 µl krvi s heparínom a skúmavky premiešajte pomocou vortexu.
- Skúmavky inkubujte pri teplote 37 °C po dobu 15 minút vo vodnom kúpeli alebo 25 minút v inkubátore.
- Potom do všetkých skúmaviek napipetujte 20 µl koktailu protilátok (Staining Reagent), skúmavky premiešajte pomocou vortexu a inkubujte 20 minút v chladničke pri 2-8°C alebo na laide.
- Potom pridajte 300 µl lyzačného roztoku (Lysing Solution), skúmavky premiešajte pomocou vortexu a inkubujte 5 minút pri laboratórnej teplote.
- Do každej skúmavky pridajte 3-4 ml demineralizovanej vody, premiešajte pomocou vortexu a inkubujte približne 5-10 minút pri laboratórnej teplote, pokým nedôjde k lýze červených krviniek.
- Centrifugujte skúmavky 5 minút pri 300 g.
- Odstráňte supernatant a resuspendujte sediment pomocou 0,2-0,4 ml tmivého roztoku PBS.
- Vzorky analyzujte prietokovým cytometrom najneskôr do 2 hodín od označenia.

Analýza v prietokovom cytometri

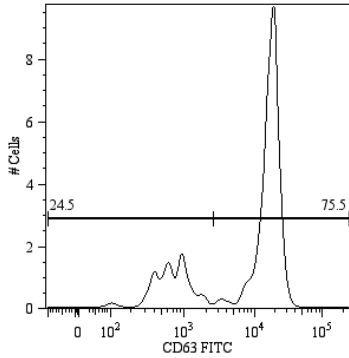
Označené vzorky analyzujte prietokovým cytometrom. Vzhľadom k tomu, že počet analyzovaných bazofilov by mal byť minimálne 200, je nutné cytometrom analyzovať 50.000-100.000 udalostí z každej vzorky. Vykompenzujte signály nameraných udalostí z jednotlivých fluorescenčných kanálov (FITC a PE kanál). Namerané dáta vyobrazte v grafe side-scatter (SSC) proti intenzite fluorescence v PE kanálu (FL2) a ohraničte vhodným regiónom populáciu bazofilov, ktoré sú CD203c pozitívne a majú nízky SSC, tak ako je to znázornené na obrázku 1 (kvôli odlišnej expresii CD203c u nestimulovanej a stimulovanej vzorky je nutné upraviť umiestnenie regiónu pre každú vzorku zvlášť).

Obr. 1 Ohraničenie populácie bazofilov (CD203c^{pos} / SSC^{low}).

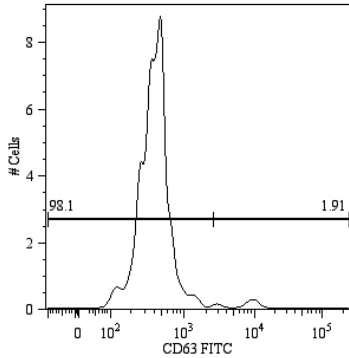


Potom vyobrazte ohraničené bazofily v histograme, kde na ose X je vynesená intenzita fluorescence vo FITC kanále (FL1), tak ako je to znázornené na obrázkoch 2a,b,c. Pomocou negatívnej kontroly nastavte región odpovedajúci CD63^{dim} populácii, ktorá predstavuje neaktivované bazofily. Potom spočítajte percentuálne zastúpenie aktivovaných bazofilov, ktoré sú CD63^{bright}, v jednotlivých alergénom stimulovaných vzorkách a u pozitívnej kontroly.

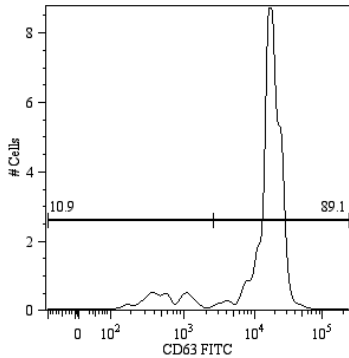
Obr. 2a Histogram populácie bazofilov po stimulácii alergénom.



Obr. 2b Histogram populácie bazofilov negatívnej kontroly.



Obr. 2c Histogram populácie bazofilov pozitívnej kontroly.



Výpočty a interpretácie výsledkov

Vypočítajte percento aktivovaných bazofilov (CD63^{bright}) vo vzorkách stimulovaných alergénom a vo vzorke pozitívnej kontroly. Pri hodnotení testu je nutné brať do úvahy hranicu pozitívity testu pre jednotlivé skupiny alergénov, ktorú by si malo ustanoviť každé laboratórium zvlášť. Hraničná hodnota pozitivity testu býva obvyčajne nastavená nasledovne:

inhalačné a potravinové alergény ≥15 %
jed blanokridleho hmyzu ≥10 %
lieky ≥5 %

≥5 %

Test nie je možné hodnotiť v prípade, že pozitívna kontrola vykazuje menej ako 20 % aktivovaných bazofilov.

10. Parametre analytického výkonu

Precíznosť (opakovateľnosť a reprodukovateľnosť)

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť merania bola stanovená duplicitným meraním šiestich senzitizedných alergénov nezávisle piatimi operátormi na jednej vzorke krvi pri rovnakých experimentálnych podmienkach. Metódou analýzy rozptylov boli stanovené nasledujúce parametre opakovateľnosti a reprodukovateľnosti merania:

CV_{opakovateľnosť} = 2,4 %
CV_{reprodukovateľnosť} = 3,4

11. Parametre klinického výkonu

Špecifickosť a Senzitivita

Špecifickosť a Senzitivita metódy bola stanovená porovnávacím meraním súpravy BasoFlowEx Kit s dvomi komerčne dostupnými BAT súpravami (A, B). Porovnanie bolo uskutočnené v rutinnom behu klinického laboratória na 100 vzorkách.

Parameter	BasoFlowEx vs. Súprava A	BasoFlowEx vs. Súprava B	Súprava B vs. Súprava A
Senzitivita (%)	96,6	85,9	94,7
Špecifickosť (%)	82,9	79,3	69,2

Očakávané hodnoty

Priemerná hodnota počtu aktivovaných bazofilov nameraných v pozitívnych kontrolách 20 krvných vzoriek je uvedená v nasledujúcej tabuľke. Počet aktivovaných bazofilov sa môže u vzoriek stimulovaných alergénom teoreticky pohybovať v rozmedzí 0-100 %.

Parameter	Priemer (%)	SD	CV (%)
Aktivované bazofily	77,3	19,4	25,1

12. Odkazy

- 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
- 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
- Erdmann SM, Heussen N, Moll-Sladowy 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
- 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
- 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. Výrobca

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. História revízií

- Verzia 1, ED7043_IFU_v1
Prvé vydanie.
- Verzia 2, ED7043_IFU_v2
Zmena textu v sekcii Upozornenie: Text "Súprava je určená pre In vitro diagnostiku a vyhovuje požiadavkám európskej smernice pre In vitro diagnostické zdravotnícke prostriedky 98/79/EC".
- Verzia 3, ED7043_IFU_v3
Varovný text bol zmenený z "Reagencia Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje < 5% formaldehydu" na "Reagencia Lysing Solution (ED7043-4) obsahuje formaldehyd a metanol".
R- a S-vety a symboly nebezpečenstva boli zmenené na H- a P-vety a GHS symboly podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008.
- Verzia 4, ED7043_IFU_v4
Text "(napr. Určených pre kožné testy)" bol odstránený z časti Použitie súpravy.
Text "(napr. Pre kožné testy)" bol odstránený z časti Potrebné vybavenie a materiál, ktorý sa nedodáva.
Text "napr.: vhodné riedené (1-10x) alergény používané na kožné testy" bol odstránený z časti Postup testu.
- Verzia 5, ED7043_IFU_v5
Zmena loga výrobcu a vzhľadu návodu na použitie.
Pridané obmedzenia pre skladovanie: "Chrániť pred slnečným žiarením".
Do sekcie Vzorka bol pridaný text "Postupujte podľa pokynov výrobcu skúmanky a uistite sa, že je dosiahnuté správneho plniaceho objemu krvi".
Do oddielu Skladovanie a zaobchádzanie bol pridaný text "Informácie o skladovaní rekonštituovaných reagentov sú uvedené v časti 9".
Zmena PSČ výrobcu z 25242 na 25250.
V sekcii "Upozornenia, preventívne opatrenia a

obmedzenia" bol pridaný text "Úplné informácie o potenciálnych nebezpečenstvách a bezpečnom spôsobe práce s výrobkom nájdete v bezpečnostnom liste produktu."
• Verzia 6, ED7043_IFU_v6
Bol upresnený text definujúci obmedzenia použitia produktu.
• Verzia 7, ED7043_IFU_v7
V časti Priebeh analýzy doplnená v bode 1 nasledujúca veta: „alebo použite jednu skúmavku s lyofilizovaným alergénom (EXBIO)."



BasoFlowEx Kit

100 testov | Kat.č. ED7043



Návod na použitie

Verzia ED7043_IFU_v7_SK
Dátum vydania: 08-04-2024

SK

Symbody



Katalógové číslo



Kód dávky



Použiť do dátumu



Obmedzenie teploty



Chrániť pred slnečným žiarením



Diagnostický zdravotnícky prostriedok *in vitro*



Označenie zhody CE



Čítajte návod na použitie



Výrobca

Produkt je určený pre In Vitro diagnostické použitie. In vivo diagnostické alebo terapeutické aplikácie sú zakázané.
Výrobky nesmú byť použité k ďalšiemu predaju alebo prevodu tretím osobám ani ako samostatný výrobok, ani ako súčasť výroby iného výrobku bez písomného súhlasu EXBIO Praha, a.s.
EXBIO Praha, a.s. nenesie zodpovednosť za porušenie patentu ani za žiadne ďalšie porušenie práv duševného vlastníctva, ktoré sa môžu vyskytnúť pri používaní týchto produktov. Objednávky na všetky produkty sú prijímané v súlade s pravidlami a podmienkami dostupnými na www.exbio.cz.
EXBIO, EXBIO Logo a všetky ostatné ochranné známky sú majetkom spoločnosti EXBIO Praha, a.s.