

Zestaw BasoFlowEx

Nr kat. ED7043

1. Cel

Przeznaczenie

Zestaw BasoFlowEx przeznaczony jest do badania metodą cytometrii przepływowej reakcji alergicznych zależnych od IgE poprzez analizę ekspozycji antygenu CD63 na bazofile w ludzkiej heparynizowanej krwi pełnej po stymulacji alergenem. Do stymulacji można zastosować dostępne na rynku alerdeny.

Kontekst stanu fizjologicznego lub patologicznego

Kluczowym elementem diagnostyki alergii jest ustalenie alergenu przyczynowego. Wiarygodność powszechnie stosowanej metody punktowego testu skórno (SPT) jest niska i test ten może sprzyjać rozwojowi choroby alergicznej u pacjenta. Dlatego wskazane są badania *in vitro*, takie jak wykrywanie swoistych IgE w surowicy (slgE) lub analiza markerów aktywacji bazoofilów. Choć swoistość detekcji slgE jest wystarczająca dla większości alergenów, to jej czułość wynosi zazwyczaj jedynie około 75 procent. Ponadto w przypadku alergenów pokarmowych i leków zarówno czułość, jak i swoistość wykrywania slgE są znacznie niższe. Natomiast test aktywacji bazoofilów (BAT) wykazuje bardzo wysoką swoistość, a także wysoką czułość, uwzględniając wiele problematycznych alergenów.

2. Zasada testu

Test BAT opiera się na stymulacji *in vitro* bazoofilów alergenem uczulającym i późniejszej analizie metodą cytometrii przepływowej ekspozycji zewnętrznego antygenu CD63 na powierzchni bazoofilów po degranulacji. Jeżeli na powierzchni komórki bazofilowej występuje wystarczająca ilość cząsteczek IgE swoistych dla alergenu, związanych z receptorami Fc ϵ RI o wysokim powinowactwie, cząsteczki alergenu sięciują receptory, prowadząc do pełnej aktywacji bazoofilów. W konsekwencji granulki cytoplazmatyczne zawierające białko transbłonowe CD63 łączą się z błoną plazmatyczną i uwalniają mediatory stanu zapalnego. Dlatego antygen CD63 jest ekspozycyjny jako marker aktywacji bazoofilów (degranulacji). Odsłonięty antygen CD63 wykrywa się poprzez barwienie przeciwciałem monoklonalnym (klon MEM-259, znakowany FITC). Populację bazoofilów identyfikuje się poprzez barwienie przy użyciu przeciwciała monoklonalnego anti-CD203c (klon NP4D6, znakowany R-fikoerytryną (PE)). Dodatnią próbkę kontrolną stymuluje się za pomocą przeciwciała monoklonalnego przeciwko cząsteczce IgE, które naśladuje proces sieciowania alergenów cząsteczek IgE na powierzchni bazofilii i za pomocą peptydu chemotaktycznego N-formylometionylo-leucylo-fenylalaniny (fMLP), który aktywuje bazofile poprzez receptor fMLP (FPR1).

3. Dostarczone odczynniki

Bufor do stymulacji ED7043-1 – 5 fiolek liofilizowanych, 1 fiołka przeznaczona jest do stymulacji 20 próbek.
Kontrola stymulacji ED7043-2 – 2 fiołki liofilizowane, 1 fiołka przeznaczona jest do stymulacji 25 kontroli pozytywnych.
Odczynnik barwiący ED7043-3 – 1 fiołka zawierająca 2 ml wstępnie zmieszanego koktajlu przeciwciał: anti-CD63, oznakowane FITC + anti-CD203c, oznakowane PE.
Roztwór lizujący ED7043-4 – 30 ml.

4. Materiały wymagane, nieobecne w zestawie

Alergeny
Odpowiednie próbki 5ml do barwienia krwi (np. 12 x 75 mm)
Bufor PBS
Ultraczysta woda demineralizowana

5. Wymagany sprzęt

Pipety automatyczne z końcówkami jednorazowymi
Mieszadło wirowe
Termostat umożliwiający inkubację próbek w temperaturze 37°C
Wirówka z rotorem przystosowanym do próbek
Cytometr przepływowy – wzbudzenie niebieskiego lasera przy 488 nm, emisja światła przy 525 nm (FITC) i 575 nm (PE)

6. Przechowywanie

Zestaw BasoFlowEx przechowywać w temperaturze 2-8°C. Chronić przed światłem słonecznym. Data ważności jest podana na etykietach fiolek i na pudełku. Informacje na temat przechowywania rekonstruowanych odczynników i ich stabilności podczas użycia znajdują się w części

9. „Procedura – przygotowanie odczynników”.

7. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia użytkowania

- Przeznaczone do stosowania w diagnostyce *in vitro* w laboratoriach poza USA i Kanadą.
- Ten zestaw CE-IVD jest zgodny z dyrektywą europejską 98/79/WE.
- Nie używać odczynników po upływie terminu ważności.
- Unikać zanieczyszczenia odczynników.
- Próbki krwi są uważane za potencjalnie zakaźne i należy się z nimi obchodzić ostrożnie.
- Unikać długotrwałego narażenia na światło odczynnika barwiącego (ED7043-3).
- Roztwór do lizy (ED7043-4) zawiera formaldehyd i metanol.

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia
H302+H312+H332: Działa szkodliwie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania.
H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry.
H351: Podejrzewa się, że powoduje raka.

Zwroty wskazujące środki ostrożności
P270: Nie jeść, nie pić i nie palić podczas stosowania tego produktu.
P280: Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.
P301+P312: W PRZYPADKU POŁKNIECIA: W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.
P302+P352: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: umyć dużą ilością wody z mydłem.
P305+P351+P338: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeśli są i można to łatwo zrobić. Kontynuować płukanie.
P501: Zawartość/pojemnik przekazać do autoryzowanego zakładu zajmującego się odpadami niebezpiecznymi.

- Pełne informacje na temat potencjalnych zagrożeń i bezpiecznego postępowania z produktem można znaleźć w Karcie Charakterystyki produktu.
- Próbka krwi może zawierać niewystarczającą liczbę bazoofilów.
- Bazofile w niektórych próbkach krwi nie są podatne na stymulację.
- Wiarygodność testu zależy od jakości alergenu.
- Cytometr przepływowy może dawać fałszywe wyniki, jeśli urządzenie nie zostało odpowiednio ustawione i nie jest właściwie obsługiwane.
- Dane mogą zostać błędnie zinterpretowane, jeśli sygnały fluorescencyjne nie zostały prawidłowo skompensowane lub jeśli bramki zostały ustawione niedokładnie.
- Wybarwione próbki należy poddać analizie w standaryzowanym przedziale czasowym, ale nie później niż 2 godziny po lizie.
- Cytometr przepływowy powinien być kalibrowany rutynowo przy użyciu mikroperekłask fluorescencyjnych, aby zapewnić stabilną czułość detektorów.
- Każde niezastosowanie się do procedury badawczej może dawać fałszywe wyniki.

8. Próbka

Do badania należy użyć ludzkiej heparynizowanej krwi pełnej.
Krew należy pobrać do próbek zawierającej heparynę. Postępuj zgodnie z instrukcjami producenta próbek, aby upewnić się, że została osiągnięta prawidłowa objętość napełnienia.
Antykoagulanty EDTA i cytryniany negatywnie wpływają na wyniki analizy.
Próbki krwi należy przechowywać w temperaturze pokojowej.
Próbki krwi należy poddać obróbce w ciągu 8 godzin od pobrania, jeśli są przechowywane w temperaturze pokojowej.
Alergeny aerozolowe (pyłki, roztocza, kurz) mogą zanieczyszczyć otwarte próbki w laboratorium i spowodować zwiększone uwalnianie w tle.

9. Procedura

Przygotowanie odczynnika

- Rozpuścić liofilizowany bufor stymulacyjny w 2 ml wody demineralizowanej. Niezużyta objętość buforu przechowywać w temperaturze 2-8°C do 5 dni. Alternatywnie bufor można podzielić na porcje, jednokrotnie zamrozić i przechowywać w temperaturze $\leq$ -20°C do późniejszego użycia. Unikać wielokrotnych cykli zamrażania/rozmarzania.
- Rozpuścić liofilizowany kontrolę stymulacji w 0,25 ml wody demineralizowanej. Niezużyta objętość odczynnika przechowywać w temperaturze 2-8°C do 30 dni. Alternatywnie, odczynnik można podzielić na porcje,

- jednokrotnie zamrozić i przechowywać w temperaturze $\leq$ -20°C do późniejszego użycia. Unikać wielokrotnych cykli zamrażania/rozmarzania.
- Inne odczynniki (odczynnik barwiący, roztwór lizujący) są gotowe do użycia.

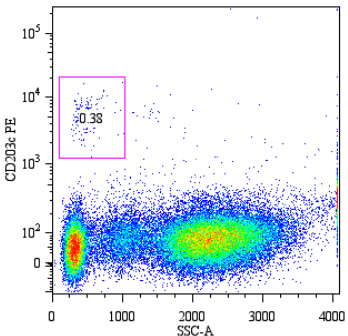
Procedura testowa

- Do badania jednej próbki krwi należy przygotować próbki do kontroli ujemnej, kontroli dodatniej oraz do stymulacji różnymi alergenami. Do stymulacji można zastosować różne dostępne w handlu alerdeny. Przygotować próbki zgodnie z poniższą procedurą.
- Dodać do próbki:
 - próbka stymulowana alergenem – 10 μ l alergenu,
 - ujemna próbka kontrolna – nic,
 - próbka kontroli pozytywnej – 10 μ l kontroli stymulacji lub użyć jednej próbki liofilizowanego alergenu (EXBIO).
 - Do wszystkich próbek dodać 100 μ l buforu stymulującego.
 - Dodać 100 μ l heparynizowanej krwi pełnej do wszystkich próbek i delikatnie wymieszać i inkubować przez 20 minut w temperaturze 2-8°C lub na lodzie.
 - Do wszystkich próbek dodać 300 μ l roztworu do lizy, delikatnie wymieszać i inkubować przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
 - Do wszystkich próbek dodać 3-4 ml wody demineralizowanej, delikatnie wymieszać i inkubować przez 5-10 minut w temperaturze pokojowej, aż do lizy czerwonych krwinek.
 - Wirować próbki przez 5 minut z prędkością 300 x g.
 - Usunąć supernatant i ponownie zawiesić osad w 0,2-0,4 ml buforu PBS.
 - Próbki należy analizować za pomocą cytometru przepływowego w ciągu 2 godzin od barwienia.

Analiza cytometrii przepływowej

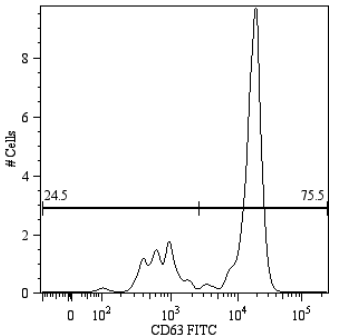
Analizować wybarwione próbki za pomocą cytometru przepływowego. Aby przeanalizować wystarczającą liczbę bazoofilów (>200), należy uzyskać 50 000-100 000 zdarzeń na próbkę. Skompensować swoje dane (kanały FITC i PE) przed lub po uzyskaniu. Zwizualizować skompensowane dane dotyczące rozproszenia bocznego (SSC) w funkcji intensywności fluorescencji na wykresie punktowym kanału PE (FL2). Ustawić bramkę dla populacji bazoofilów (CD203c^{dodatni}, SSC^{niski}), jak pokazano na rysunku 1. Bramkę należy ustawić indywidualnie dla każdej próbki.

Rys. 1. Delimitacja populacji bazoofilów (CD203c^{dodatni} / SSC^{niski}).

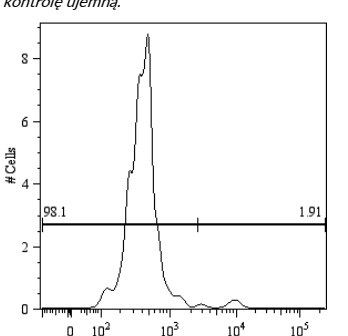


Następnie nakreślić bramkowane bazofile jako histogram pokazany na rysunkach 2 a, b, c, gdzie oś X przedstawia intensywność fluorescencji w kanale FITC (FL1). Ustawić bramkę dla niestymulowanych bazoofilów (CD63^{dim}), używając próbki kontroli ujemnej.

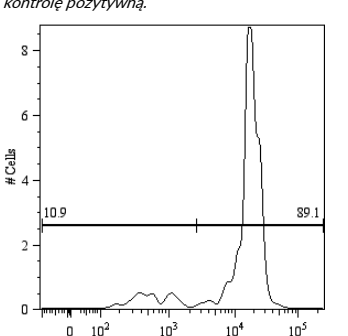
Rys. 2a Histogram bazoofilów stymulowanych alergenem.



Rys. 2b Histogram bazoofilów stanowiących kontrolę ujemną.



Rys. 2c Histogram bazoofilów stanowiących kontrolę pozytywną.



Obliczenia i interpretacja wyników analitycznych

Obliczyć procent aktywowanych bazoofilów (CD63^{jasny}) w próbkach stymulowanych alergenem i próbce kontroli pozytywnej. Za uczuloną na badane alerdeny uznaje się osobę, której odsetek aktywowanych bazoofilów przekracza wartość odcięcia. Zalecane wartości odcięcia dla grup alergenów są następujące:

Alergeny wziewne i pokarmowe	$\geq$ 15 %
Jady błonkoskrzydłych	$\geq$ 10 %
Leki	$\geq$ 5 %

Jeśli próbka kontroli dodatniej wykazuje aktywację bazoofilów < 20%, próbek stymulowanych alergenem nie można interpretować.

10. Wydajność analityczna

Precyzja (powtarzalność i odtwarzalność)

Powtarzalność i odtwarzalność testu określono na podstawie danych zmierzonych przez pięciu operatorów stosujących sześć alergenów uczulających w dwóch równoległych odstępach na jednej próbce krwi w tych samych warunkach doświadczalnych. Korzystając z Analizy wariancji obliczono następujące parametry:

Powtarzalność CV = 2,4%
Odtwarzalność CV = 3,4%

11. Wydajność kliniczna

Swoistość i czułość

Swoistość i czułość testu określono poprzez porównanie zestawu BasoFlowEx Kit z dwoma konkurencyjnymi testami BAT dostępnymi na rynku. Porównanie przeprowadzono w rutynowym laboratorium klinicznym na 100 testach.

Parametr	BasoFlowEx vs. Por. A	BasoFlowEx vs. Por. B	Por. B vs. Por. A
Czułość (%)	96,6	85,9	94,7
Swobodność (%)	82,9	79,3	69,2

Oczekwane wartości

Poniżej wymieniono średnią liczbę aktywowanych bazofilów zmierzoną w 20 próbkach kontroli pozytywnej. Teoretycznie liczba aktywowanych bazofilów w próbce stymulowanej alergenem może wahać się w zakresie 0-100%.

Parametr	Średnia (%)	SD	CV (%)
Aktywowane bazofile	77,3	19,4	25,1

12. Bibliografia

- 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-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
- 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. Producent

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 50 Vestec
Republika Czeska

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

14. Znaki towarowe

nie dotyczy

15. Historia zmian

- Wersja 1, ED7043_IFU_v1
Pierwsze wydanie
- Wersja 2, ED7043_IFU_v2
Zmiana tekstu w sekcji Środki ostrożności: usunięto tekst „Przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego” i zastąpiono go tekstem „Przeznaczony do użytku w diagnostyce in vitro w laboratoriach poza USA i Kanadą. Niniejszy zestaw CE-IVD jest zgodny z europejską dyrektywą dotyczącą wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro 98/79/WE”.
- Wersja 3, ED7043_IFU_v3
Tekst ostrzeżenia został zmieniony z „Roztwór do lizy (ED7043-4) zawiera < 5% formaldehydu” na „Roztwór do lizy (ED7043-4) zawiera formaldehyd i metanol”.
Zwroty R i S oraz symbole zagrożenia zostały zmienione na zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia i zwroty wskazujące środki ostrożności oraz symbole GHS zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008.
- Wersja 4, ED7043_IFU_v4
Tekst „np. używany do testów punktowych” został usunięty z sekcji „Zastosowanie zgodne z przeznaczeniem”.
Tekst „(np. do testów punktowych)” został usunięty z sekcji Niezbędne materiały, które nie są dostarczane.
Tekst „np. alergeny w testach punktowych w odpowiednim rozcieńczeniu (1–10x)” został usunięty z sekcji „Procedura testowa”.
- Wersja 5, ED7043_IFU_v5
Zmieniono logo firmy.
Zmieniono układ IFU.
Dodano frazę „chronić przed światłem słonecznym” w sekcji Przechowywanie.
Do sekcji Próbką dodano tekst „Postępować zgodnie z instrukcjami producenta próbki, aby upewnić się, że została osiągnięta prawidłowa objętość napełnienia”.
Tekst „Patrz rozdział 9, „Procedura – przygotowanie odczynnika”, aby uzyskać informacje na temat przechowywania rekonstruowanych odczynników i ich stabilności podczas użytkowania.” został dodany do sekcji Przechowywanie i obsługa.

Zmieniono kod pocztowy producenta z 25242 na 25250.
Tekst „Patrz Karta charakterystyki produktu, aby uzyskać pełne informacje na temat potencjalnych zagrożeń i sposobu bezpiecznej pracy z produktem.” dodano do sekcji Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia stosowania.
• Wersja 6, ED7043_IFU_v6
Poprawiono tekst dotyczący ograniczeń użycia produktu.
• Wersja 7, ED7043_IFU_v7
W części „Procedura testowa” w punkcie 1 dodano zdanie: „lub użyć jednej próbki liofilizowanego alergenu (EXBIO).”



Zestaw BasoFlowEx

100 testów | Nr kat. ED7043



Instrukcja użycia

Wersja ED7043_IFU_v7_PL
Data wydania: 08-04-2024

Symbole

- REF Numer katalogowy
- LOT Kod partii
- Data przydatności do użycia
- Limity temperatur
- Chronić przed światłem słonecznym
- IVD Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
- CE Oznakowanie CE
- Zapoznaj się z instrukcją użycia
- Producent

Produkt jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce in vitro. Zastosowania diagnostyczne lub terapeutyczne in vivo są surowo zabronione.
Produkty nie mogą być wykorzystywane do odsprzedaży lub przekazywania osobom trzecim ani jako samodzielny produkt, ani jako element produkcyjny innego produktu bez pisemnej zgody EXBIO Praha, a.s.
EXBIO Praha a.s. nie ponosi odpowiedzialności za naruszenie patentu lub inne naruszenia praw własności intelektualnej, które mogą wystąpić w związku z użytkowaniem produktów. Zamówienia na wszystkie produkty są przyjmowane zgodnie z Warunkami dostępnymi na stronie www.exbio.cz. EXBIO, logo EXBIO i wszystkie inne znaki towarowe są własnością EXBIO Praha, as