

Kit Basostep

Prueba de activación de basófilos



REF	Σ	
BSTP-100	100 pruebas	
BSTP-S-100	100 pruebas	RUO

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Reactivo suministrado: combinación de anticuerpos monoclonales.

Aplicación probada: citometría de flujo

Tampón de almacenamiento: solución tamponada acuosa que contiene estabilizador de proteínas y azida sódica al 0,09 % (NaN₃).

Uso recomendado: El kit BASOSTEP de Immunostep está destinado a la determinación cuantitativa de la desgranulación de los granulocitos basófilos en sangre total humana heparinizada. BASOSTEP está destinado a la citometría de flujo para el análisis de reacciones alérgicas mediadas por IgE mediante el análisis de la superficie del antígeno CD63 en basófilos tras la estimulación con alérgenos mediante citometría de flujo. Este reactivo es eficaz para la tinción por inmunofluorescencia directa para el análisis por citometría de flujo utilizando $\leq 20 \mu\text{l}/106$ células.

Presentación: líquido

Reactivos suministrados y preparación:

- Tampón de estimulación:** contiene calcio, heparina e IL-3. 3 viales liofilizados. Reconstituir con 10 ml de agua desmineralizada. Tras la reconstitución, conservar a 2-8 °C durante una semana o dividir en alícuotas y congelar.

- Control de estimulación:** Contiene fMLP y anti-IgE. 1 vial liofilizado. Reconstituir con 0,4 ml de agua desmineralizada. Tras la reconstitución, conservar a 2-8 °C durante una semana o dividir en alícuotas y congelar.

- Reactivo de tinción:**
 - Mezcladeanticuerpos (Ref. BSTP-100): CD63 FITC; CD203c PE; HLA-DR PerCP; CD123 APC
 - Mezcla de anticuerpos (Ref. BSTP-S-100): CD63 FITC; CD203c PE

2. RELEVANCIA CLÍNICA

En personas susceptibles, las células B producen IgE en respuesta a antígenos específicos, como alimentos, polen, látex y fármacos. Esta IgE específica del antígeno (o específica del alérgeno) circula en el suero y se une a receptores de IgE de alta afinidad en células efectoras inmunitarias, como los mastocitos, que se encuentran por todo el cuerpo. Tras una exposición posterior al mismo alérgeno, los receptores de IgE se entrecruzan e inician eventos de señalización posteriores que desencadenan la desgranulación de los mastocitos y una respuesta alérgica inmediata, de ahí el término «hipersensibilidad inmediata».

Los basófilos se encuentran entre las poblaciones menos abundantes de leucocitos circulantes, pero, gracias a su sensibilización con IgE específica frente a alérgenos, constituyen una población efectora significativa en la patogénesis alérgica. Se sabe que los basófilos son una fuente temprana y abundante de citocinas Th2 y otros mediadores de la inflamación Th2. También se reconoce cada vez más su capacidad para modular la inmunidad adaptativa. El kit se basa en el método descrito por Sainte-Laudy et al. en 1994, en el que la activación de los basófilos por alérgenos se detecta mediante citometría de flujo, midiendo el aumento de CD63 (gp53) en la superficie celular.

BASOSTEP permite la determinación cuantitativa de la desgranulación de los basófilos humanos. El ensayo incluye el péptido quimiotáctico N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP) como control positivo y un cóctel de anticuerpos para la detección y determinación de la activación de los basófilos desgranulados. Por lo tanto, el ensayo BASOSTEP se basa en la estimulación in vitro de los basófilos utilizando fMLP como control positivo y el posterior análisis por citometría de flujo de la expresión de CD63 en la membrana de los basófilos tras la desgranulación. Mediante el uso de alérgenos definidos, esta prueba proporciona información sobre la capacidad de liberación de los basófilos portadores de IgE.

Cuando los receptores de IgE de los basófilos se unen a un alérgeno, las células sufren desgranulación a través de gránulos citoplasmáticos que contienen la proteína transmembrana CD63, que se fusiona con la membrana plasmática y libera mediadores inflamatorios. Por lo tanto, el antígeno CD63 queda expuesto como marcador de la activación de los basófilos.

3. DETALLES DEL ANTÍGENO

Descripción detallada: El clon TEA3/18 de CD63 es una glicoproteína lisosomal de tipo III de 53 kDa, expresada en plaquetas activadas, monocitos y macrófagos. El CD63 contiene cuatro dominios transmembranales hidrofóbicos con 53 kDa con un principal extracelular región de 95 aminoácidos entre los segmentos transmembranales 3 y 4.

El clon NP4D6 de CD203c se expresa en los basófilos y los mastocitos. La expresión de CD203c se regula al alza en los basófilos activados por alérgenos o por la reticulación de IgE. Por lo tanto, CD203c se utiliza como indicador de la activación de los basófilos en diversas respuestas alérgicas mediadas por IgE. El CD203c también se conoce como ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3 (E-NPP3). Los miembros de la familia ENPP catalizan la hidrólisis de los enlaces pirofosfato y fosfodiéster en nucleósidos 5'-monofosfatos.

El clon GRB1 de HLA-DR (solo en la ref. BSTP-100) está dirigido contra el antígeno HLA-DR. El anticuerpo reacciona con las células del linaje monocítico, con los mieloblastos y los promielocitos, y con las células del linaje de los linfocitos B. Los basófilos dan negativo. El HLA-DR está presente en los linfocitos B, las células precursoras hematopoyéticas, las células T activadas, las células monocíticas y los macrófagos.

El anticuerpo monoclonal del clon AC145 contra CD123 (solo en la referencia BSTP-100) reacciona con el CD123 humano, la cadena α del receptor de la IL-3. Esta proteína transmembrana de 60-70 kDa se une a la IL-3 con baja afinidad por sí sola, y cuando se asocia con el CD131 (cadena β común) se une a la IL-3 con alta afinidad. El CD123 se expresa en los megacariocitos.

4. CONDICIONES ADECUADAS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Pueden formarse cristales durante el almacenamiento a 2-8 °C, por lo que deben disolverse a 18-28 °C antes de su uso. Conservar en la oscuridad.

No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en el vial. Si se observa una tinción inesperada que no pueda explicarse por variaciones en los procedimientos de laboratorio y se sospeche de un problema con el producto, póngase en contacto con nuestro Servicio Técnico. (tech@immunostep.com).

5. SEÑALES DE DETERIORO

No se deben utilizar los reactivos si se observa cualquier indicio de deterioro.

El aspecto normal del producto es el de un líquido semitransparente e incoloro. No debe utilizarse si el medio líquido está turbio o contiene precipitado. Debe ser inodoro.

6. RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS

- Los reactivos contienen azida sódica. En condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazoico, un compuesto altamente tóxico. Los compuestos de azida deben diluirse en agua corriente antes de desecharlos. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías, donde podrían desarrollarse condiciones explosivas. La ficha de datos de seguridad (FDS) está disponible en línea en www.immunostep.com
- Evite la contaminación microbiana del reactivo.
- Protéjalo de la luz. Utilice luz tenue durante la manipulación, la incubación con células y antes del análisis.
- Nunca pipetee con la boca.
- En caso de contacto con la piel, lávese con abundante agua.
- Las muestras deben manipularse de la misma forma que aquellas que pueden transmitir infecciones. Deben garantizarse procedimientos de manipulación adecuados.
- No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en el vial.
- Cualquier desviación del procedimiento recomendado podría invalidar los resultados del análisis.
- SOLO PARA USO EN INVESTIGACIÓN.**
 - Solo para uso profesional.
 - Antes de obtener las muestras, es necesario asegurarse de que el citómetro de flujo esté calibrado y compensado.

7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

-Tampón de estimulación: 3 frascos de tampón de estimulación liofilizado que deben reconstituirse en 10 ml de agua ultrapura y apirógena proporcionan 30 ml de tampón de estimulación 1X listo para usar.

-Control de estimulación: 1 vial que contiene el péptido quimiotáctico fMLP y anticuerpos anti-IgE humanos liofilizados, que debe reconstituirse en 0,4 ml de agua ultrapura y apirógena, permite realizar 40 pruebas.

1 Mezcle la muestra de sangre total humana heparinizada y anticoagulada invirtiendo el frasco de la venopunción varias veces.

2 Para cada paciente, etiquete los siguientes tubos:

- Tubo de control positivo
- Tubo de control negativo
- A1 para el alérgeno 1. Se recomienda realizar pruebas con varias diluciones de cada
- alérgeno (p. ej., 1:100; 1:1000; 1:10 000; 1:100 000; 1:1 000 000). A2 para el alérgeno 2 ...

- Se debe preparar una serie de diluciones del alérgeno en medio para basófilos. Prepare varias diluciones seriadas al décimo del alérgeno estimulante, en un rango de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 1 ng/ml , en 100 μl de tampón de estimulación. Añada 100 μl de tampón de estimulación al tubo de control negativo y 90 μl de tampón de estimulación + 10 μl de control positivo al tubo de control positivo.
- Añada 100 μl de sangre total heparinizada y mezcle suavemente (con un vórtex).
- Las muestras se incuban durante 20 minutos a 37 °C en un baño de agua.
- Añada 20 μl de reactivo de tinción a cada tubo. Agite con el vórtex e incube durante 20 minutos a una temperatura de entre 2 y 8 °C o en hielo.
- Añada el reactivo de lisis a los tubos e incube según las instrucciones del fabricante.
- Centrifugue los tubos durante 5 minutos a 540 x g.
- Aspire suavemente el sobrenadante sin alterar el sedimento celular y desecharlo, dejando aproximadamente 50 μl de líquido.
- Añada 2 ml de PBS 0,01 mol/l (es preferible que contenga un 0,5 % de albúmina sérica bovina) y resuspenda las células. Mezcle bien.
- Centrifugue a 540 g durante 5 minutos. Aspire con cuidado el sobrenadante y deséchelo, dejando aproximadamente 50 μl de líquido.
- Resuspende el sedimento en 0,3 ml de PBS. Se recomienda utilizar PBS que contenga un 0,5 % de albúmina sérica bovina, sobre todo si las muestras no se van a analizar de inmediato.

Analizar en un citómetro de flujo o conservar a 2-8 °C en la oscuridad hasta el momento del análisis. Las muestras pueden analizarse hasta 3 horas después de la lisis. Si las muestras no se analizan inmediatamente, agitar energicamente en el vórtex justo antes de la adquisición.

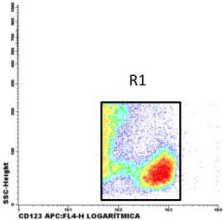
8. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Antes de adquirir las muestras, compruebe que el citómetro esté correctamente alineado y estandarizado para la dispersión de la luz (los parámetros FSC y SSC deben estar ajustados en amplificación lineal) y la intensidad de fluorescencia (los parámetros FL1, FL2, FL3, FL4... deben estar ajustados en amplificación logarítmica) y que la compensación de color se haya configurado siguiendo las instrucciones del fabricante del citómetro.

Antes de recoger las muestras, ajuste al mínimo el umbral o el discriminador en el parámetro FSC para minimizar los residuos y garantizar que se incluya la población de interés.

Mezcle suavemente las muestras a mano inmediatamente antes de analizarlas en el citómetro de flujo para garantizar una resuspensión completa de las células y las microesferas.
Ref.:BSTP-100

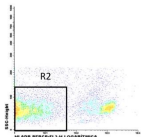
Configure el citómetro para almacenar solo los eventos en la región R1, como se muestra en la imagen siguiente:



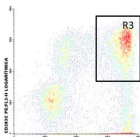
Adquiera y almacene todos los eventos R1 posibles. Se recomienda adquirir a una velocidad baja o media para evitar la formación de agregados celulares.

Ejemplo de análisis: Los siguientes histogramas corresponden al análisis de una muestra de sangre de un individuo sano utilizando el Basostep.

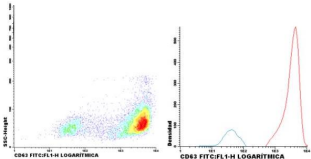
Paso 1: Seleccione la población de R2 y a continuación R3



Sample activated with fMLP

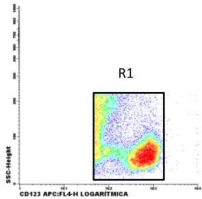


Paso 2: Analice los resultados utilizando la intensidad de fluorescencia de CD63



El histograma es una representación de una muestra de sangre total normal lisada, seleccionada en CD123+/CD203c+/HLA-DR. El control negativo se representa mediante el histograma gris y el control positivo mediante el histograma rojo.

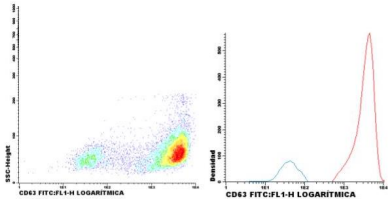
Configure el citómetro para almacenar solo los eventos en la región R1, como se muestra en la imagen siguiente:



Adquiera y almacene todos los eventos R1 posibles. Se recomienda adquirir a una velocidad baja o media para evitar agregados celulares.

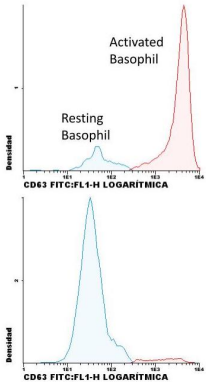
Ejemplo de análisis: Los siguientes histogramas corresponden al análisis de una muestra de sangre de un individuo sano utilizando el Basostep:

Paso I: Analice los resultados utilizando la intensidad de fluorescencia de CD63.



El histograma muestra los resultados de una muestra de sangre total normal lisada, seleccionada por CD203+. El control negativo se representa mediante el histograma gris y el control positivo mediante el histograma rojo

Ejemplo de análisis de datos:



9. ALÉRGENOS DISPONIBLES

Alérgenos no suministrados: contacta con tech@immunostep.com para recibir el catálogo disponible o revisalo directamente en la página web: <https://immunostep.com/es/product/basostep/?v=12470fe406d4>

10. GARANTÍA

Se garantiza únicamente que se ajusta a la cantidad y al contenido indicados en la etiqueta o en el etiquetado del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia por la presente a cualquier otra garantía. La única responsabilidad de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

11. REFERENCIAS

1. Sainte-Laudy, J, et al. Análisis de la expresión de membrana del marcador de activación de basófilos humanos CD63. Aplicaciones al diagnóstico alergológico. Allerg. Immunol. Paris 26, 211-4 (1994)
2. Sabbah, A y Sainte-Laudy, J. Citometría de flujo aplicada al análisis de la activación de linfocitos y basófilos. ACI International 8, 116-9 (1996)
3. Chirumbolo et al. Respuesta diferencial de los marcadores de activación de los basófilos humanos: un enfoque de citometría de flujo multiparamétrica. Clinical and Molecular Allergy 2008, 6:12
4. Peter Valent et al. Ensayo para medir la activación in vitro de los basófilos inducida por alérgenos recombinantes. Methods 32 (2004) 265-270

12. EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

	Formulario
	Referencia de catálogo
	Contiene cantidad suficiente para más de un
	Cantidad por prueba
	Estado regulatorio
	Solo para uso en investigación
	Concentración
	Fabricante

13. FABRICADO POR:



Dirección: Avda. Universidad de Coimbra, s/n Centro de Investigación Oncológica (C.I.C) Campus de Unamuno 37007 Salamanca (España)

Tel./fax: (+34) 923 294 827
Correo electrónico: info@immunostep.com
www.immunostep.com