



# Flow CAST<sup>®</sup>

## Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry

Til *in vitro*-diagnostisk anvendelse

FK-CCR 100 tests

Udgivelsesdato: 2023-06-21  
Version A2

---

 Producent

BÜHLMANN Laboratories AG  
Baselstrasse 55  
4124 Schönenbuch, Schweiz  
Tel.: +41 61 487 1212  
Fax: +41 61 487 1234  
[info@buhlmannlabs.ch](mailto:info@buhlmannlabs.ch)



## TILSIGTET ANVENDELSE

BÜHLMANN Flow CAST® er en in vitro diagnostisk test til kvalitativ vurdering af basofil aktivering ved stimulering med specifikke allergener. Testen anvender flowcytometri til at bestemme den basofile population, der udtrykker CD63-celleoverflademærker i patient K-EDTA fuldblodsprøver. Flow CAST® er beregnet som en hjælp til diagnosticering af umiddelbare allergiske lidelser i forbindelse med andre kliniske og laboratoriefund.

Kun til laboratoriebrug.

## ANALYSEPRINCIP

Flow CAST® er en flowcytometri-baseret basofil aktiveringstest (ref. 1, 2). Fuldblod fra patienter stimuleres med specifikke allergener samt stimuleringsbuffer og stimuleringskontroller for at evaluere patientens basofile degranulering ex vivo. Prøven farves ved hjælp af to fluorescensmærkede monoklonale antistoffer: et til basofil selektion (anti-CCR3-PE) og et til bestemmelse af basofil aktiveringsstatus (anti-CD63-FITC) (ref. 3-6). CD63 er et transmembranprotein til stede på intracellulære vesikler og kun præsenteret på celleoverfladen efter basofile degranulering (ref. 7).

Erythrocytter fra patientprøven fjernes ved en lyseringsreaktion. Afhængigt af protokollen centrifugeres cellerne, resuspenderes i vaskebuffer og fikseres til senere analyse ved flowcytometri eller analyseres direkte efter lysning. Basofiler er isolerede fra leukocytpopulationen som CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>. Aktiveringsstatus for de isolerede basofiler bestemmes af deres CD63-ekspression (aktiveringsmærker). Patienter, der ikke fremkalder IgE-medierede allergiske reaktioner, såkaldte non-responders, identificeres ud fra resultaterne af de positive kontroller. Aflæsningen af assayet er angivet som forholdet mellem CD63-positive basofiler over alle basofiler (% CD63-aktivering).

## REAGENSER LEVERET OG FORBEREDELSE

Reagenser	Kvantitet	Kode	Kommentarer
<b>Stimuleringsbuffer</b> indeholder calcium, heparin og IL-3	1 hætteglas lyofiliseret	B-CCR-STB	Rekonstituer i 50 mL vand <sup>1)</sup>
<b>Stimuleringskontrol anti-Fc<math>\epsilon</math>RI mAb</b>	1 hætteglas lyofiliseret	B-CCR-STCON	Rekonstituer i 1.5 mL B-CCR-STB
<b>Stimuleringskontrol fMLP <sup>2)</sup></b>	1 hætteglas lyofiliseret	B-CCR-FMLP	Rekonstituer i 1.5 mL B-CCR-STB
<b>Farvningsreagens</b> Mix af anti-CD63-FITC og anti-CCR3-PE mAb	1 hætteglas 2.2 mL	B-CCR-SR	Klar til brug
<b>Lyseringsreagens <sup>3)</sup></b> 10x koncentreret	1 hætteglas 25 mL	B-CCR-LYR	Fortyndes med 225 mL deioniseret vand
<b>Vaskebuffer</b> Med 0.1% formaldehyde	1 hætteglas 100 mL	B-CCR-WB	Klar til brug

Tabel 1

<sup>1)</sup> For påkrævet vandkvalitet henvises til kapitlet Tekniske forholdsregler

<sup>2)</sup> N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

<sup>3)</sup> Krystaller kan dannes under opbevaring ved 2-8°C og bør opløses ved 18-28°C før fortynding

## REAGENSOPBEVARING OG -HOLDBARHED

Uåbnede reagenser	
Opbevares ved 2-8 °C. Brug ikke reagenserne efter den udløbsdato, der er trykt på etiketterne.	
Åbnede og rekonstituerede reagenser	
Stimuleringsbuffer	Stabilt ved -20°C i 6 måneder. Ved gentagen brug, anbefales alikvoter.
Stimuleringskontrol	
Stimuleringskontrol fMLP	
Lyseringsreagens	Stabilt ved 2-8°C i 6 måneder.
Farvningsreagens	
Vaskebuffer	

Tabel 2

## NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- K-EDTA venipunktur rør
- Centrifuge
- Engangs, pyrogenfri polypropylen eller polystyren flow cytometri testrør
- Flow cytometri test tube racks til stimulerings trin
- Vortex mixer
- (Valgfri) Tissue culture grade microtiter plade til celle stimulering og farvning i standard protokollen
- (Valgfri) Deepwell plader til celle stimulering, farvning, lysis og flow cytometri analyse i lyse no-wash protokol
- Precisions pipetter med engangs pyrogen fri tips:
  - 10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L,
  - 1-5 mL justerbar pipette og
  - Valgfri: 10-50  $\mu$ L justerbar dispenser
- 50 mL beholder til rekonstitution af stimuleringsbuffer
- Sterilt, ultrarent og pyrogenfrit vand til rekonstitution af stimuleringsbuffer (henvises til kapitlet Tekniske forholdsregler)
- Vandbad (anbefalet) eller incubator indstillet til på 37°C
- Destilleret eller de-ioniseret vand, samt passende beholder til fortynding af lysing reagens
- Låg eller parafilm til at afdække rør under inkubation
- Bottle-tip dispenser til lyseringsreagens og vaskebuffer
- Flow cytometer udstyret med 488nm(blue) laser source samt emissions filtre til PE og FITC detektion
- Flow cytometrisk software (henvises til afsnittet dataanalyse)

## ALLERGENER BESTILLES SEPARAT

Allergener valideret til Flow CAST® bestilles separat fra BÜHLMANN. For bestillingsnumre samt information omkring præparation af allergener henvises til BÜHLMANN Allergen Booklets på BÜHLMANN's website:

www.buhlmannlabs.ch

**Vigtigt:** Flow CAST® er kun testet i kombination med CAST® Allergens, tilgængelige fra BÜHLMANN Laboratories AG. Det er udelukkende laboratoriets ansvar at validere brugen af allergener der kommer fra andre kilder.

## FORHOLDSREGLER

### Sikkerhedsforholdsregler

- Stimuleringsbuffer (B-CCR-STB) indeholder komponenter af human oprindelse. Selvom reagentet er testet og fundet negativ for HBV overflade-antigen, HCV og HIV1/2 antistoffer, skal reagentet håndteres som værende mulig smittebærer, og håndteres i henhold til Good Laboratory Practices (GLP), og der skal tages de nødvendige forholdsregler.
- Undgå kontakt med reagentet på huden, i øjnene og, slimhinder. Hvis der opstår kontakt, skylles øjeblikkelig med rigelige mængder vand.
- Reagenser og kemikalier skal behandles som farligt affald, i henhold til national biohazard safety guideline eller regulativ.

### Tekniske forholdsregler

- Anbefalet vandkvalitet til Flow CAST®: Brugen af sterilt, ultrarent og apyrogen vand til at rekonstituere stimuleringsbuffer (B-CCR-STB) er afgørende for god og reproducerbar basofil stimulering. Følgende typer vand kan bruges: vand af cellekulturkvalitet, vand af infusionskvalitet eller deioniseret, dobbeltdestilleret vand, der er ultrafiltreret i et periodisk desinficeret 10 kDa.
- Lysereagenset (B-CCR-LYR) kan rekonstitueres med deioniseret, dobbeltdestilleret vand eller den samme vandkvalitet, som bruges til rekonstituering af stimuleringsbufferen.
- Undgå allergenkontamination under cellestimulering: Aeroallergener i laboratoriet kan kontaminere åbne blodprøver og celsuspensioner, hvilket forårsager en forhøjet baggrund. Blodprøver og cellestimuleringsrør skal omhyggeligt dækkes af låg eller parafilm. Undgå husstøvmider, bestøvende planter, latexhandsker eller udstyr, der potentielt indeholder latex, samt åbne vinduer i laboratoriet, hvor cellestimuleringen udføres. Det anbefales at udføre celleforberedelses- og stimuleringsstrinene i en laminar flow-kabinet.
- Et vandbad anbefales sammenlignet med en inkubator, på grund af mere effektiv varmeoverførsel. Hvis du bruger en inkubator, skal du kontrollere, at temperaturen er 37°C. Lavere eller højere temperaturer kan påvirke resultaterne.
- Generelt forventes lavt niveau af basofil aktivering for lægemiddelallergener. Det er derfor afgørende, at der opnås optimale betingelser under stimulering, inklusive temperatur. Det anbefales at bruge enkelt rør i stedet for deep well plader til lægemiddelallergener.
- Komponenter må ikke bruges efter den udløbsdato, der er trykt på etiketterne.
- Bland ikke forskellige lot af reagenser.
- Undgå Kontamination af reagenser.

### Testprocedure

- Ekvilibrer lysing reagent til stuetemperatur (18-28 °C).
- Læs instruktionerne omhyggeligt, inden testen udføres. Testens ydeevne vil blive negativt påvirket, hvis reagenser er forkert fortyndet, håndteret eller opbevaret under andre forhold end dem, der er beskrevet i denne brugsanvisning.
- Prøver, der ikke håndteres korrekt, kan forårsage unøjagtige resultater.

- Kontroller præparaterne visuelt for at vurdere effektiviteten af lyseringen. Erythrocytterne kan være ufuldstændigt lyserede og kan ses på et lys-diffraktions dot plot på samme sted som leukocytterne.
- Forlænget lyseringstid kan føre til celletab. Sørg for, at du har mindst 300 basofiler til analyse. Vi anbefaler, at analyse af prøver behandlet med lyse-no-wash-protokollen udføres inden for en time.
- Flowcytometri kan give falske resultater, hvis: cytometeret er forkert justeret, fluorescensemissionen ikke er blevet korrekt kompenseret, gating-områderne ikke er blevet omhyggeligt placeret.

## INDSAMLING OG OPBEVARING AF PRØVER

Det anbefales, at patienter undgår systemisk administrerede anti-allergene lægemidler såsom kortikosteroider, chromoglycinsyre (DSCG) i mindst 24 timer før blodprøvetagning.

Saml blod i **K-EDTA venepunktur rør** ved at fylde rørene op til det markerede volumen. Rørene skal fyldes mindst halvvejs. En (1) ml fuldblod er tilstrækkeligt til ca. 18 reagensglas.

### Undgå centrifugering og nedfrysning af blodprøver

#### Fuldblod

Fuldblodsprøver opbevaret ved 2-8 °C bør behandles inden for 48 timer efter indsamling.

Til bestemmelse af allergiske lidelser over for lægemidler tilrådes det at behandle prøver straks og senest 24 timer efter prøvetagning.

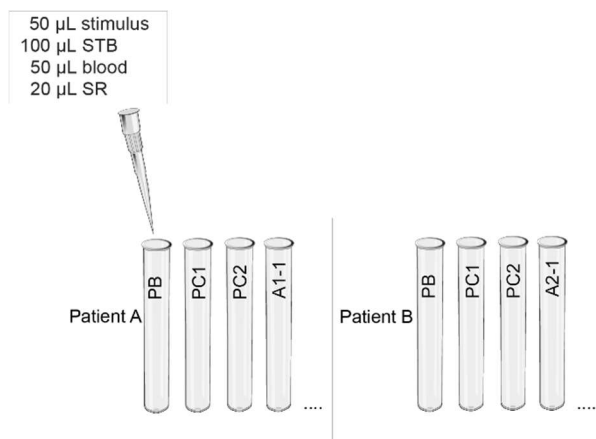
Fuldblodsprøver kan også opbevares ved stuetemperatur (temperaturer op til 28 °C). De skal dog behandles inden for 24 timer efter afhentning ved hjælp af standardprotokollen eller på afhentningsdagen ved hjælp af lyse-no-wash protocol.

#### Forarbejdede prøver

Celler behandlet ved hjælp af standardprotokollen er fikseret. fikserede celler kan opbevares ved 2-8 °C i 5 dage beskyttet mod lys til efterfølgende analyse ved flowcytometri.

## ANALYSEPROCEDURE

1. Bland den anti-koagulerede blodprøve ved at vende venepunktur røret flere gange.
2. Klargør nye og pyrogenfri standard-polypropylen- eller polystyren-flowcytometrirør.
3. For hver patient mærkes rørene f.eks. det følgende:  
PB = patient baggrund  
PC1 = stimuleringskontrol med anti-FcεRI Ab  
PC2 = stimuleringskontrol med fMLP  
A1-1 for allergen 1 med fortynding 1  
A1-2 for allergen 1 med fortynding 2 etc.



## Stimulering og farvning

- Tilsæt 50 µL af det korresponderende stimuli til hver rør:  
PB tube: 50 µL **stimuleringsbuffer** (patient baggrund)  
PC1 tube: 50 µL **stimuleringskontrol** anti-FcεRI mAb  
PC2 tube: 50 µL **stimuleringskontrol** fMLP  
Ax-y tube: 50 µL **allergen**
- Tilsæt 100 µL stimuleringsbuffer (STB) til hver rør .
- Tilsæt 50 µL af patientens fuldblod til hver rør. Kontroller at der ikke er blod på sider eller kant af røret.
- Mix forsigtigt.
- Tilsæt 20 µL farvningsreagens (SR) til hvert rør.
- Mix forsigtigt, overdæk rørene og inkuber 15 minutter ved 37 °C i et **vandbad**.

**Note:** Hvis der bruges en inkubator I stedet for vandbad, skal inkubationstiden forlænges til 25 minutter på grund af mindre effektiv varmeoverførsel.

## Lysering

**Note:** Lyseringsreagens skal ekvilibreres til stuetemperatur. (18-28 °C).

## Standard protokol: Lyse and wash

- Tilsæt 2 mL ekvibreret (18-28 °C) lyseringsreagens til hver rør. Mix forsigtigt.
  - Inkuber i 5-10 minutter ved 18-28 °C.
  - Centrifuger røret 5 minutter 500 x g.
  - Dekanter supernatanten ved hjælp af blotting papir.
  - Resuspender celle pellet i 300 µL vaskebuffer (et fixative er tilsat i vaskebuffer).
- Note:** Mængden af vaskebuffer kan tilpasses til den specifikke flowcytometer-instrument, der anvendes, i overensstemmelse med det dødvolumen og den celletæthed, der er kompatibel med enheden.
- Vortex forsigtigt.

**Enten** 16a. analyser prøver på flow cytometer.

**Eller** 16b. Hvis ikke prøverne analyseres med det samme, inkuberes de i 30 minutter ved stuetemperatur og beskyttet mod lys (fixation). Opbevar prøverne forseglede og beskyttet mod lys ved 2-8 °C indtil de analyseres. Fixerede Celler kan opbevares ved 2-8 °C i 5 dage til yderligere analyse på flow cytometer. Vortex forsigtigt prøven inden aflæsning.

**Note:** Opbevarede fikserede celler kan, til enhver tid, analyseres uden nogen forbehandling. Se I afsnittet "Indsamling og opbevaring af prøver" for opbevaringstider. Et mindre fald i fluorescence intensitet og en lavere basophil

recovery  $\geq 80\%$  kan forekomme efter opbevaring i længere tid.

## Alternative protokol: Lyse-no-wash protokol

Nyere high-performance flow cytometre kan analysere lyserede, uvaskede prøver. Denne procedure skal tilpasses det flow cytometer der benyttes, og kan kræve optimering. Protokollen nedenfor er baseret på data opnået med et Attune NxT flowcytometer (Thermo Fisher).

10. Udfør analyseprocedure trin 1 til 9 (ovenfor), og fortsæt derefter ved trin 10 her. Tilsæt  $1,5 \pm 0,5$  mL ækvibreret (18-28 °C) lyseringsreagens til hvert rør, bland forsigtigt (volumen skal optimeres afhængigt af det anvendte flowcytometer).

11. Analyser prøverne ved hjælp af en egnet flowcytometer med højt flow for at holde analysetiden minimal.

**Bemærk:** Prøver skal analyseres inden for 24 timer efter modtagelse af prøven. Se venligst afsnittet "Indsamling og opbevaring af prøver".

## FLOWCYTOMETRISK ANALYSE

Flowcytometrisk analyse kan udføres på ethvert flowcytometer, der arbejder med en 488 nm argon laserdioder (blågrønt excitationsslys).

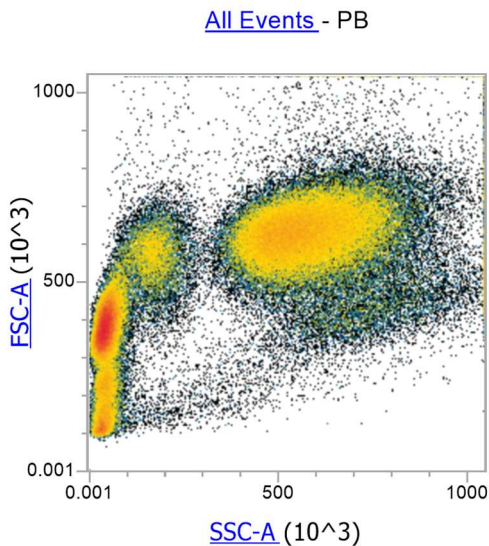
Flowcytometeret skal være udstyret til at detektere Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) og de to fluorokromer FITC- og PE-kanaler.

Sørg for, at flowcytometeret er korrekt justeret, og at farvekomensation er indstillet.

For den passende erhvervelse og karakterisering af inaktive og aktiverede basofiler skal du oprette følgende dot plot (punktplot):

- Opret dot plot 1, som Forward Scatter vs Side Scatter for at erhverve hele leukocytpopulationen som vist i figur 1. Under indsamling af prøverne skal du sørge for, at leukocytpopulationen er adskilt i tre adskilte populationer (lymfocytter, monocytter og granulocytter) på FSC/SSC-dot plottet. Juster amplifikationen (forstærkningen) af FSC- og SSC-signaler for at opnå en fordeling som vist i figur 1. Se flowcytometerets produktmanualer for instruktioner.
- Opret dot plot 2, som CCR3-PE vs Side Scatter som vist i figur 2. Indstil en gate (f.eks. basofile) inklusive hele basofile populationen som CCR3<sup>pos</sup> og SSC<sup>low</sup> som vist med rektangel gatet i figur 2. Eosinofiler, der er også CCR3<sup>pos</sup>, skal udelukkes baseret på den høje SSC.
- Opret dot plot 3, som CD63-FITC vs CCR3-PE, der kun viser de gatede basofiler, som vist i figur 3. Brug de ikke-stimulerede, hvilende basofiler i patientbaggrunds røret (PB) til at indstille en kvadrantgate, inklusive CD63 negative basofile celler i nederste højre kvadrant (CD63<sup>neg</sup> CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>) som vist i figur 3. Basofiler aktiveret ved stimulering af positive kontroller og specifikke allergener vil resultere i CD63 positiv basofil population (CD63<sup>pos</sup>/CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>) identificeret i den øvre højre kvadrant, som vist i figur 4 med et eksempel på positiv kontrolstimulering (STCON).

Aflæsningen af assayet er angivet som forholdet mellem CD63-positive basofiler over alle basofiler (%CD63-aktivering) som identificeret i kvadrantgaten af dot plot 3 for et hvilket som helst af stimuleringsrørene.



Figur 1: Tre adskilte populationer (lymfocytter, monocytter og granulocytter) på et FSC/SSC-punktplot.

500 eller flere basofile celler er nødvendige til hver stimuleringsrør (GATET som vist i dot plot 2, figur 2 nedenfor). Hvis der er mindre end 300 basofile celler (f.eks. i tilfælde af basopenia), kan testresultater ikke evalueres.

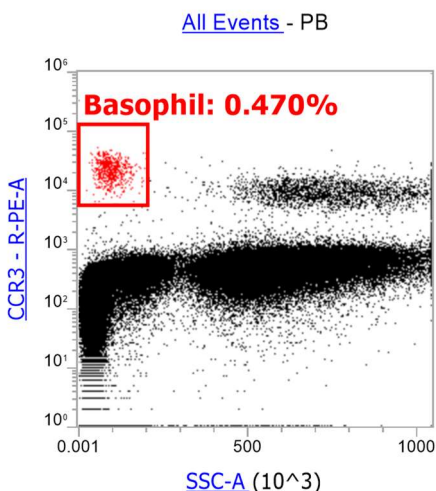
## DATAANALYSE

Indhentede data analyseres med passende flowcytometrianalyse software. Indstil tilsvarende dotplot og gates som gjort ved analysen.

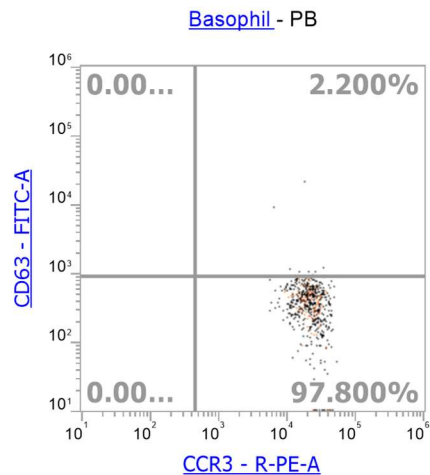
De gates, der identificerer basofilerne i dot plot 2, kan tilpasses uafhængigt i enhver af de forskellige stimuleringer til den samme patientprøve.

For den korrekte evaluering og standardisering af resultaterne defineres en baggrundsindstilling for hver enkelt patient ved hjælp af patientens baggrundsstimulering (PB). Kvadrantgaten indstillet på dot plot 3 skal defineres indstillet på PB. For at standardisere analysen er gatingen indstillet til at være mellem 2 og 2,5 % aktiverede basofiler i PB-prøven fra hver patient (se figur 3).

Denne port skal anvendes på alle efterfølgende stimulationer for de samme patienter (PC1, PC2 og alle målte allergener) for at beregne procentdelen af CD63-positive celler i enhver stimulation (se figur 4)

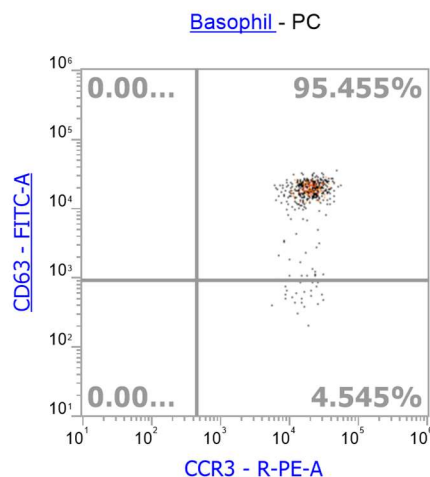


Figur 2: Selektion af basofile celler CCR3<sup>pos</sup> / SSC<sup>low</sup>



Gated-region	Antal (n=)	%
I alt	125'864	100.0
Basofil	591	0.47
Q2 (CD63 <sup>pos</sup> )	13	2.2
Q4 (CD63 <sup>neg</sup> )	578	97.8

Figur 3: Patient baggrund (PB) kun med STB



Gated-region	Antal (n=)	%
I alt	130'926	100.0
Basofil	506	0.39
Q2 (CD63 <sup>pos</sup> )	483	95.5
Q4 (CD63 <sup>neg</sup> )	23	4.5

Figur 4: Stimuleringskontrol (STCON)

## KVALITETSKONTROL

Følgende kriterier og kvalitetskontrolforanstaltninger skal være opfyldt for et gyldigt resultat:

**Leukocytpopulationer:** Typisk skal tre forskellige leukocytpopulationer lymfocytter, monocytter og granulocytter vises i FSC/SSC-plottet (se figur 1). Deres forekomst kan betragtes som et kriterium for kvaliteten af blodprøven (tidsramme mellem prøvetagning og udførelse af assay, opbevaringsbetingelser). Testresultater kan ikke evalueres, hvis der er mindre end 300 basofiler tilstede.

**Stimulerings (positiv) kontrollerer anti-FcεRI mAb og fMLP:** Anti-FcεRI mAb efterligner brodannelsen af receptoren forårsaget af allergenet *in vivo*. fMLP er et tripeptid, der forårsager basofil aktivering på en ikke-immunologisk måde.

- Hvis Anti-Fc $\epsilon$ RI mAb -kontrollen udviser en værdi på  $\geq 10\%$  aktiverede basofiler, kan prøverne evalueres.
- Hvis kun fMLP-kontrollen viser et signal  $\geq 10\%$ , men Anti-Fc $\epsilon$ RI mAb'en ikke gør det, er analysen udført korrekt, men testresultaterne kan ikke evalueres. Patienten betragtes som en IgE-non-responder.
- Hvis både Anti-Fc $\epsilon$ RI mAb og fMLP udviser værdier  $< 10\%$  aktiverede basofiler, er en teknisk fejl sandsynlig. Testresultatet bør betragtes som ugyldigt, og testen bør gentages.

## STANDARDISERING

Flow CAST<sup>®</sup> detekterer populationen af basofiler, der udtrykker CD63-cellernes overflademærker som % af det samlede antal basofiler. Der er ingen internationalt eller nationalt anerkendt referencemateriale eller referencemålingsprocedurer for denne analyt.

Batch-til-batch-reproducerbarhed er garanteret ved titrering af anti-CD63-FITC og anti-CCR3-PE monoklonale antistofkonjugater mod kalibrerings beads. For et estimat af batch-til-batch-variation henvises til reproducerbarhedsresultater i afsnittet "ydeevnekaraktistika".

## BEGRÆNSNINGER

- Flow CAST<sup>®</sup> testresultater skal fortolkes i sammenhæng med anden kliniske og laboratorie data
- For at bestemme lægemiddelrelaterede allergiske lidelser bør BAT-test udføres inden for 6 måneder efter den allergiske reaktion (ref. 8).
- Sørg for, at der er gået mindst en til to uger efter en allergisk reaktion, før du udfører BAT-test (ref. 8).
- Negative resultater opnået for lægemiddelallergener bør ikke bruges til allergiudlukkelse.
- Det forventes, at 5 til 10% af patienterne vil være IgE-non-respondere. For disse patienter vil opregulering af CD63-ekspression og et positivt resultat ikke blive observeret. Ikke-respondere kan identificeres ved hjælp af stimuleringskontroller, der følger med Flow CAST<sup>®</sup>-testen (ref. 9).
- Utilstrækkeligt fyldte K-EDTA-rør (mindre end halvt fyldte) kan føre til falsk negative resultater.
- Interferens med Flow CAST<sup>®</sup> testresultater forventes for patienter under omalizumab (XOLAIR<sup>®</sup>) behandling (ref. 10).
- Systemisk administrerede antiallergene lægemidler såsom kortikosteroider, chromoglycinsyre (DSCG) bør undgås i mindst 24 timer før blodprøvetagning.

## FORTOLKNING AF RESULTATER

Flow CAST<sup>®</sup> resultat kategorier er som følger:

Resultat	Fortolkning
$<$ cut-off	negativ
$\geq$ cut-off for en eller begge fortyndinger af allergenet	positiv

Tabel 3

## CUT-OFF OG REFERENCEINTERVAL

Der er etableret en teknisk cut-off på 5% aktiverede basofiler, hvor resultater  $\geq 5\%$  CD63<sup>POS</sup> indikerer basofil aktivering.

For hvert allergen opnås forbedret specificitet ved at bruge de allergen-specifikke cut-offs som angivet i BÜHLMANN Allergen Booklets.

Referenceintervaller er fastsat i henhold til CLSI C28-A3. Et hundrede og tyve (120) blodprøver fra et bloddonationscenter blev stimuleret med stimuleringsbuffer eller Anti-Fc $\epsilon$ RI mAb og testet i henhold til standard- og lyse-no-wash-protokoller. Testning blev udført i løbet af 26 dage af tre operatører med to Flow CAST<sup>®</sup>-reagens lots.

Kontrol	Analyse-protokol	Referenceinterval (90% CI) [% CD63 <sup>POS</sup> ]	
		2,5-percentil	97,5-percentil
Stimulering sbuffer	standard	0.8 (0.5 - 1.2)	4.6 (4.1 - 6.4)
	lyse-no-wash	0.9 (0.6 - 1.0)	4.2 (3.9 - 5.3)
Anti-Fc $\epsilon$ RI mAb	standard	18.0 (11.5 - 26.0)	97.7 (96.0 - 98.5)
	lyse-no-wash	13.2 (11.4 - 21.2)	96.4 (94.3 - 97.3)

Tabel 4

## KLINISK YDEEVNE

Den kliniske ydeevne af Flow CAST<sup>®</sup> er evalueret i en systematisk videnskabelig litteraturgennemgang. Elleve peer-reviewed undersøgelser identificeret i en systematisk litteratursøgning, der dækker en periode frem til november 2019, en undersøgelse af insektgifte, der ikke blev identificeret i den oprindelige søgning og to undersøgelser af jordnødderallergener offentliggjort efter 2019, blev inkluderet i analysen. Studierne undersøgte Flow CAST<sup>®</sup>s evne til at skelne mellem forsøgspersoner med allergiske lidelser og ikke-allergiske forsøgspersoner. Allergiske lidelser hos den allergiske forsøgsperson er blevet bekræftet af enten a) patientens kliniske anamnese, b) oral food challenge (OFC) eller provokationstest, c) klinisk historie og laboratorietest (hudprick - SPT, slgE) eller d) klinisk historie og OFC/ provokationstest. Studier med brug af slgE eller SPT som eneste kliniske reference blev udelukket. Resultaterne er opsummeret i tabel 5.

Allergen-gruppe	N undersøgelser	Sensitivitet median (interval)	Allergiske forsøgspersoner (i alt)	Specificitet median (interval)	Kontrolpersoner (i alt)
Fødevarer Inhalationsmidler	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Insektgifte	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Lægemidler	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Tabel 5

## YDEEVNEKARAKTERISTIKA

**Præcision inden for laboratoriet:  $\leq 25\%$  CV for stimulus**  
 Repeterbarheden (inden for kørsel) og præcisionen inden for laboratoriet blev etableret baseret på CLSI-retningslinjen EP05-A3 og ISO-standard 15197:2013. Fire donorblodprøver blev stimuleret med stimuleringsbuffer eller stimuleringskontrol anti-Fc $\epsilon$ RI mAb. Til standardproceduren

blev der brugt et 2 operatører x 4 dage x 1 kørsel x 4 replikater under-søgelsesdesign. Til lyse-no-wash blev der anvendt et 2 operatører x 1 dag x 4 kørsler x 4 replikater under-søgelsesdesign. Et replikat svarer til en uafhængig stimuleringsreaktion og en fuld analyseprocedure. Resultaterne for stimuleringskontrol anti-FcεRI mAb er opsummeret i tabel 6.

Analyse-protokol	Donor	Gennemsnit [%CD63]	n	Inden for kørsel [%CV]	Mellem dage (A) Mellem kørsler (B) [%CV]	I alt [%CV]
standard (A)	A	34.7	32	8.8%	0.0%	15.9%
	B	90.3	32	1.3%	2.0%	3.6%
	C	82.4	32	1.8%	0.0%	5.1%
	D	91.4	32	1.1%	4.5%	5.0%
lyse-no-wash (B)	E	89.5	32	1.5%	1.1%	1.9%
	F	74.0	32	2.7%	3.5%	6.0%
	G	68.2	32	4.2%	12.5%	15.5%
	H	73.9	32	3.3%	2.9%	5.2%

Tabel 6

### Reproducerbarhed: ≤25% CV for stimulus

Reproducerbarheden blev etableret baseret på CLSI-retningslinjen EP05-A3 og ISO-standarden 15197:2013. Fire donorblodprøver blev stimuleret med stimuleringsbuffer eller stimuleringskontrol anti-FcεRI mAb. Prøver blev analyseret på to laboratoriesteder i overensstemmelse med standardprotokollen. Et 3 instrumenter/partier x 2 operatører x 1 dag x 5 replikater undersøgelsesdesign blev anvendt. Et replikat svarer til en uafhængig stimuleringsreaktion og en fuld analyseprocedure. Resultaterne for stimuleringskontrol anti-FcεRI mAb er opsummeret i tabel 7.

Donor	Gennemsnit [%CD63]	n	Inden for kørsel [%CV]	Mellem operatører [%CV]	Mellem lots/instrumenter [%CV]	I alt [%CV]
A	91.6	30	1.4%	2.1%	1.9%	3.2%
B	87.6	30	1.7%	1.2%	3.3%	3.9%
C	91.9	30	0.8%	0.9%	2.1%	2.5%
D	96.5	30	0.5%	0.0%	0.8%	0.9%

Tabel 7

## INTERFERERENDE STOFFER

Flow CAST®-assayets følsomhed over for lægemidler, unormale blodforhold og K-EDTA-prøveadditivet er blevet vurderet i henhold til CLSI-retningslinjen EP07-A2. Bias i resultater, der overstiger 20% for stimuleringskontrol anti-FcεRI mAb og 20% CD63<sup>pos</sup> (absolut) for stimuleringskontrol fMLP, blev betragtet som interferens. Der blev ikke påvist interferenser ved de angivne koncentrationer med stofferne anført i tabel 8 ved de angivne koncentrationer. Interferens blev påvist med K-EDTA ved dobbelt K-EDTA venepunkturrørkoncentration for én donor .

Aktiv komponent	Test Concentration [µg/mL]
Fexofenadine hydrochlorid	1.6
Cetirizin dihydrochlorid	4.35
Hydroxyzin-dihydrochlorid	0.27
Ketotifen	0.6
Montelukast	3.84
Prednison	1.2
N-Acetyl-L-tryptophan	30
Triglycerid (intralipid)	20'000
Bilirubin konjugeret	400
Bilirubin ukonjugeret	400
Hæmolyse	56'100

Tabel 8



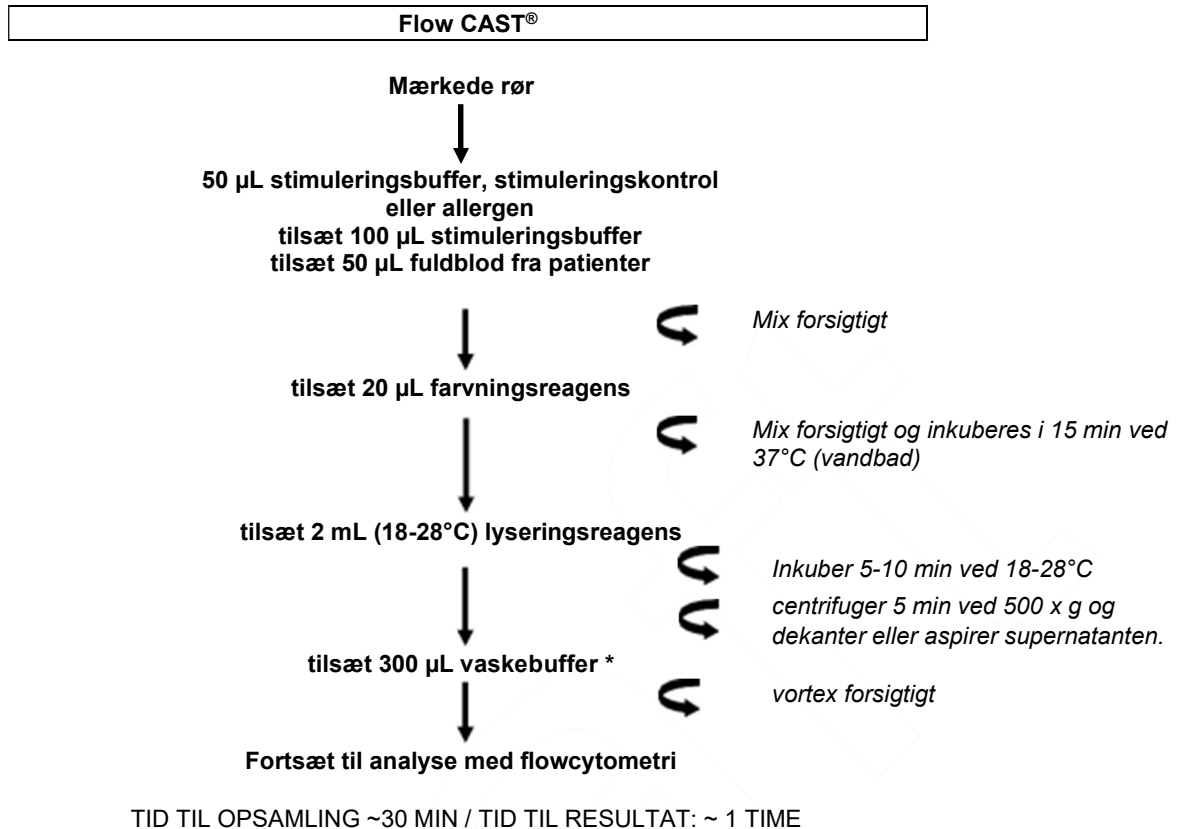
---

## REFERENCER

1. Sainte-Laudy, J, et al. [Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis]. *Allerg Immunol (Paris)* 26, 211-4. (1994).
2. Sabbah, A and Sainte-Laudy, J. Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation. *ACI International* 8, 116-9 (1996).
3. Ugucioni, M., C. R. Mackay, et al. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 100(5): 1137-43 (1997).
4. Sanz, ML, et al. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 32, 277-86. (2002).
5. De Weck, AL and Sanz, ML. Flow cytometric cellular allergen stimulation Test (FAST/Flow-CAST): technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo-allergy. *ACI International* 14, 204-215 (2002).
6. Eberlein, B. et al. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin. Exp. Allergy* 40, 411–418 (2010).
7. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol.*;88(3 Pt 1):328-38 (1991).
8. Hoffmann HJ, Santos AF, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 70:1393–1405 (2015).
9. Leysen, J. et al. The basophil activation test in the diagnosis of immediate drug hypersensitivity. *Expert Rev Clin Immunol* 7, 349–355 (2011).
10. Johansson, S. G. O., Lilja, G., Hallberg, et al. A clinical follow-up of omalizumab in routine treatment of allergic asthma monitored by CD-sens. *Immun. Inflamm. Dis.* 6, 382–391 (2018).

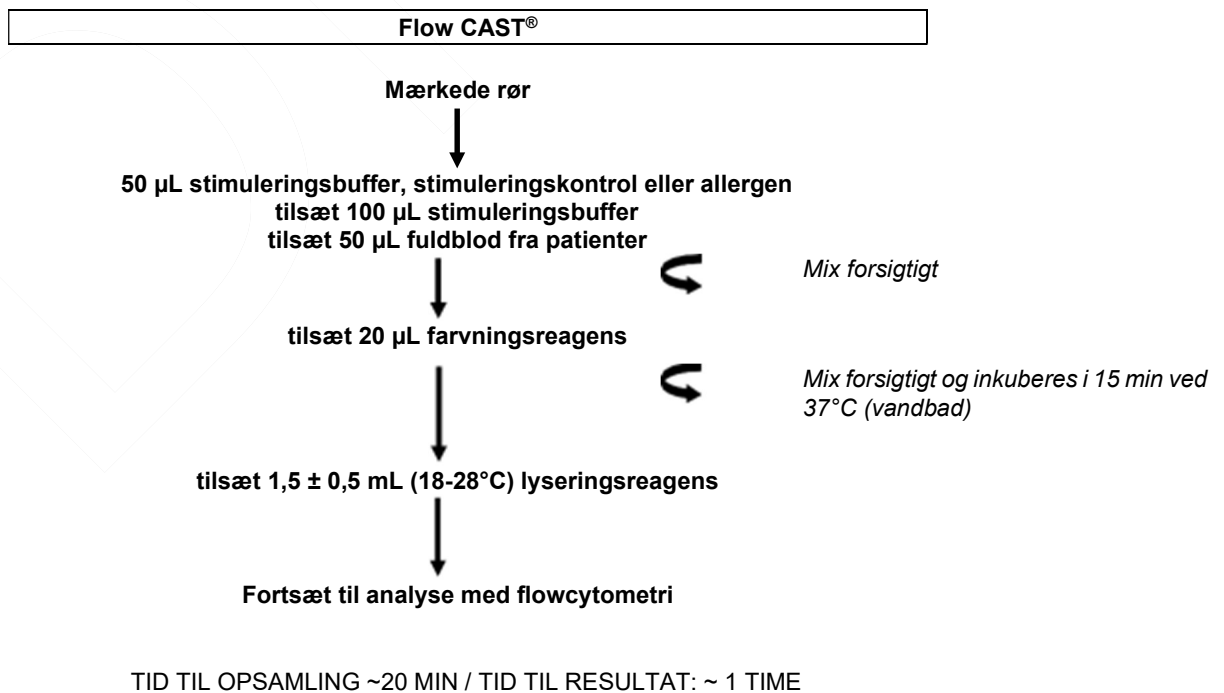
## KORT PROTOKOLS

### STANDARD PROTOKOL: LYSE AND WASH



\* Bemærk: Afhængigt af det flowcytometerinstrument, der anvendes, skal mængden af vaskebuffer tilpasses i forhold til dødvolumen og celletæthed, der er kompatibel med instrumentet.

### ALTERNATIVE PROTOKOL: LYSE-NO-WASH PROTOKOL



---

## ÆNDRINGSLOG

Dato	Version	Ændring
2023-06-21	A2	Omformulering i kapitel <i>Dataanalyse</i> og <i>Klinisk ydeevne</i> Inkludering af bemyndiget body nummer til CE-mærke – overensstemmelses vurderingsprocedure i henhold til IVDR 2017/746

---

## HÆNDELSESINDBERETNING I EU-MEDLEMSLANDE

En hvilken som helst hændelse, der har forekommet med denne anordning, skal omgående indberettes til producenten og den kompetente myndighed i dit medlemsland.

---

## TRANSPORTSKADER

Underret din forhandler, hvis produktet modtages i beskadiget stand.

## SYMBOLER

BÜHLMANN gør brug af de symboler og skilte, som er angivet om beskrevet i ISO 15223-1. Derudover anvendes følgende symboler og skilte:

Symbol	Forklaring
BUF   STIM	Stimuleringsbuffer
CONTROL   STIM	Stimuleringskontrol
CONTROL   FMLP	Stimuleringskontrol fMLP
REAG   STAIN	Farvningsreagens
REAG   LYS	Lyseringsreagens
BUF   WASH	Vaskebuffer