



Flow CAST®

Bazofil aktivációs teszt (BAT)
Áramlási citometria

In vitro diagnosztikai használatra

FK-CCR 100 teszt

Kiadási dátum: 2023-06-21
Verzió A2



BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Svájc
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

RENDELTESSZERŰ HASZNÁLAT

A BÜHLMANN Flow CAST® egy *in vitro* diagnosztikai teszt a bazofil aktiváció kvalitatív értékelésére specifikus allergénekkal történő stimuláció hatására. A teszt áramlási citometriát alkalmaz a CD63 sejtfelszíni markert expresszáló bazofil populáció meghatározására a betegek K-EDTA teljes vérmintáiban. A Flow CAST® az azonnali típusú allergia betegségek diagnózisának segédeszközeként szolgál, más klinikai és laboratóriumi leletekkel együtt. Kizárólag laboratóriumi használatra.

A VIZSGÁLAT ELVE

A Flow CAST® egy áramlási citometrián alapuló bazofil aktivációs teszt (ref. 1, 2). A betegek teljes vérének specifikus allergénekkal, valamint stimulációs pufferrel és stimulációs kontrollokkal stimulálják, hogy *ex vivo* értékeljék a beteg bazofil degranulációját. A mintát két fluoreszcensen jelölt monoklonális antitesttel festik meg: egy a bazofil szelektációhoz (anti-CCR3-PE) és egy a bazofil aktivációs státusz meghatározásához (anti-CD63-FITC) (ref. 3-6). A CD63 egy transzmembrán fehérje, amely intracelluláris vezikulákon van jelen, és csak a bazofil degranuláció után jelenik meg a sejtfelszínen (ref. 7).

A beteg mintájából a vörös vértesteket egy lizálási lépéssel távolítják el. A protokolltól függően a sejteket centrifugáljuk, mosópufferben reszuszpendáljuk és fixáljuk a későbbi áramlási citometriás elemzéshez, vagy közvetlenül a lízis után mérjük. A bazofilokat CCR3^{pos}/SSC^{low}-ként kapuzzák a leukocita populációból. A kijelölt bazofilok aktivációs státuszát a CD63 expressziójuk (aktivációs marker) alapján határozzuk meg. A pozitív kontrollok eredményei alapján azonosítják azokat a betegeket, akik nem váltanak ki IgE-mediált allergiás választ, az úgynevezett nem-válaszolókat. A vizsgálat eredményét a CD63 pozitív bazofilok aránya adja meg az összes bazofilhoz képest (%CD63 aktiváció).

MELLÉKELT REAGENSEK ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

Reagensek	Mennyiség	Kód	Megjegyzések
Stimulációs puffer kalciumot, heparint és IL-3-at tartalmazó	1 fiola liofilizált	B-CCR-STB	50 mL vízzel feloldjuk ¹⁾
Stimulációs kontroll anti-FcεRI mAb	1 fiola liofilizált	B-CCR-STCON	1,5 mL B-CCR-STB-vel feloldani
Stimulációs kontroll fMLP ²⁾	1 fiola liofilizált	B-CCR-FMLP	1,5 mL B-CCR-STB-vel feloldani
Jelölő reagens Anti-CD63-FITC és anti-CCR3-PE mAb keveréke	1 fiola 2,2 mL	B-CCR-SR	Használatra kész
Lizáló reagens ³⁾ 10x koncentrát	1 fiola 25 mL	B-CCR-LYR	Hígítsuk 225 mL ionmentesített vízzel
Mosópuffer 0,1% formaldehiddel	1 fiola 100 mL	B-CCR-WB	Használatra kész

1. táblázat

¹⁾ Az előírt vízminőségre vonatkozóan lásd a Technikai óvintézkedések részt

²⁾ N-formil-metionil-leucil-fenilalanin

³⁾ A 2-8 °C-on történő tárolás során kristályok képződhetnek, amelyeket hígítás előtt feloldani 18-28 °C-on

A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGI IDEJE

Reagensek még nem felnyitott (nem használt) állapotban:	
2-8 °C-on tároljuk. Ne használjuk fel a reagenseket a címken feltüntetett lejárati időn túl.	
Felbontott reagensek és beoldott reagensek	
Stimulációs puffer	-20 °C-on 6 hónapig tárolható. Ismételt felhasználás esetén aliquotonként osszuk szét.
Stimulációs kontroll	
Stimulációs kontroll fMLP	
Lizáló reagens	2-8 °C-on 6 hónapig tárolható.
Jelölő reagens	
Mosópuffer	

2. táblázat

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

- K-EDTA vérvételi csövek
- Centrifuga
- Egyszer használatos, pirogénmentes polipropilén vagy polisztirol áramlási citometriás csövek
- Áramlási citometriás cső állványok a stimulációhoz
- Vortex mixer
- (opcionális) szövetkultúra minőségű mikrotiterlemez a sejtstimulációhoz és a standard protokollhoz szükséges festéshez
- (opcionális) mély lyukú lemez a sejtstimulációhoz, festéshez, lízishez és áramlási citometriás méréshez a lyse-no-wash protokollhoz.
- Precíziós pipetták eldobható, pirogénmentes hegyekkel:
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - 1-5 mL-es állítható pipetta és
 - Opcionális: 10-50 µL-es állítható adagoló
- 50 mL-es mérőhenger a stimulációs puffer feloldásához
- Steril, ultratiszta és pirogénmentes víz a stimulációs puffer beoldásához (lásd a Technikai óvintézkedések részt)
- Vízfürdő (ajánlott) vagy inkubátor 37 °C-ra állítva
- desztillált vagy ioncserélt víz, valamint megfelelő laboratóriumi üvegedények a lizáló reagens hígításához
- Fedelek vagy parafólia a csövek lefedésére az inkubációs lépések során
- Palackos adagolók a lizáló reagens és a mosópuffer számára
- 488 nm-es (kék) lézerforrással, valamint PE és FITC detektálásra szolgáló emissziós szűrőkkel felszerelt áramlási citométer.
- Áramlási citometriai elemző szoftver (lásd az Áramlási citometriai adatgyűjtés fejezetet)

ALLERGÉNEK KÜLÖN RENDELHETŐEK

A Flow CAST® méréshez validált allergéneket a BÜHLMANN külön biztosítja. Az allergén rendelési kódokat, valamint az allergén előkészítéssel kapcsolatos információkat a BÜHLMANN honlapján található BÜHLMANN allergén füzetekben találja:

www.buhmannlabs.ch

Fontos: A Flow CAST® csak a BÜHLMANN Laboratories AG által forgalmazott CAST® allergénnel együtt került tesztelésre. A más forrásból származó allergének használatának validálása kizárólag a laboratórium felelőssége.

ÖVINTÉZKEDÉSEK

Biztonsági óvintézkedések

- A teszt stimulációs pufferje (B-CCR-STB) emberi eredetű összetevőket tartalmaz. Bár a HBV felszíni antigén, HCV és HIV1/2 antitestek tekintetében negatívnak bizonyult, a reagenseket úgy kell kezelni, mintha fertőzések átvitelére alkalmasak lennének, és a helyes laboratóriumi gyakorlatnak (GLP) megfelelően, a megfelelő óvintézkedések alkalmazásával kell kezelni.
- Kerülje a reagensek bőrrel, szemmel vagy nyálkahártyával való érintkezését. Ha mégis érintkezésbe kerül, azonnal bőséges mennyiségű vízzel mossa le.
- A reagenseket és vegyszereket veszélyes hulladékként kell kezelni a nemzeti biológiai veszélyekre vonatkozó biztonsági irányelveknek vagy rendeleteknek megfelelően.

Technikai óvintézkedések

- Ajánlott vízminőség a Flow CAST® teszthez: A jó és reprodukálható bazofil stimulációhoz elengedhetetlen a steril, ultratiszta és pirogénmentes víz használata a stimulációs puffer (B-CCR-STB) beoldásához. A következő vizek használhatóak: sejt-kultúra minőségű víz, infúziós minőségű víz vagy ionmentesített, kétszeresen desztillált víz, amelyet ultraszűrőnek időszakosan fertőtlenített 10 kDa ultraszűrőn.
- A lizáló reagens (B-CCR-LYR) deionizált, kétszer desztillált vízzel vagy a stimulációs puffer rekonstitúciójához használt vízminőséggel oldható be.
- Kerülje az allergén szennyeződést a sejtstimuláció során: A laboratóriumban lévő aeroallergének szennyezhetik a nyitott vérmintákat és a sejtszuszpenziókat, ami megnövekedett háttérszintet okozhat. A vérmintákat és a sejtstimulációs csöveket gondosan le kell fedni fedővel vagy parafóliával. Kerülje a háziporátka, a beporzó növények megjeleését a laboratóriumban, a latexkesztyűk vagy a potenciálisan latexet tartalmazó berendezések használatát, valamint ne nyitott ablakok mellett végezzük a sejtstimulációt. A sejtjelőkészítés és a stimulálás lépéseit lamináris áramlású elszívóban ajánlott elvégezni.
- A hatékonyabb hőátadás miatt a vízfürdő használata ajánlott az inkubátorral szemben. Inkubátor használata esetén ellenőrizze, hogy a hőmérséklet 37 °C legyen. Az alacsonyabb vagy magasabb hőmérséklet befolyásolhatja az eredményeket.
- Általában alacsony szintű bazofil aktiváció várható a gyógyszerallergének esetében. Ezért döntő fontosságú, hogy a stimuláció során optimális körülményeket teremtsünk, beleértve a hőmérsékletet is. A gyógyszerallergének esetében mély üregű lemezek helyett csövek használata ajánlott.
- Az összetevők nem használhatók fel a címkén feltüntetett lejáratú idő után.
- Ne keverje össze a különböző lot számhoz tartozó reagenseket.

- Kerülje a reagensek szennyeződését.

A teszteljárás

- A lizáló reagens szobahőmérsékletűek (18-28 °C) legyenek.
- A teszt elvégzése előtt figyelmesen olvassa el a honlapon található utasításokat. A teszt teljesítményét hátrányosan befolyásolja, ha a reagenseket helytelenül hígítják, kezelik vagy tárolják a jelen használati utasításban részletezettéltől eltérően.
- A nem megfelelően kezelt minták pontatlan eredményeket okozhatnak.
- Ellenőrizze szemrevételezéssel, hogy felmérje a lízis hatékonyságát. Előfordulhat, hogy az eritrociták nem megfelelően lízálódtak, és a pontdiagramon ugyanott jelennek meg, mint a leukociták.
- A hosszabb lízisdő sejtvesztéshez vezethet. Biztosítsa, hogy az adatgyűjtéshez legalább 300 bazofil álljon rendelkezésre. Javasoljuk, hogy a lyse-no-wash protokollal feldolgozott minták adatgyűjtését egy órán belül végezze el.
- Az áramlási citometria hamis eredményeket adhat, ha: a citométer rosszul van beállítva, a fluoreszcens emissziót nem kompenzálták megfelelően, a kapuzott területek nem lettek gondosan elhelyezve.

MINTA GYŰJTÉS ÉS TÁROLÁS

Javasoljuk, hogy a betegek a vérvétel előtt legalább 24 órával kerüljék a szisztémásan alkalmazott antiallergén gyógyszereket, például kortikoszteroidokat, kromoglikonsavat (DSCG).

K-EDTA vérvételi csövekbe történjen a vérvétel, a csöveket az erre a célra szolgáló térfogatjelzésig feltöltve. A csöveket legalább félig meg kell tölteni. Egy (1) mL teljes vér körülbelül 18 csőhöz elegendő.

Ne centrifugálja vagy fagyassza le a vérmintákat.

Teljes vér

A 2-8 °C-on tárolt teljes vérmintákat a gyűjtéstől számított 48 órán belül fel kell dolgozni.

A gyógyszerallergiák meghatározásához a mintákat azonnal, de legkésőbb 24 órával a mintavételt követően ajánlatos feldolgozni.

A teljes vérminták szobahőmérsékleten is tárolhatók (28 °C-ig). Ezeket azonban a gyűjtést követő 24 órán belül fel kell dolgozni a standard protokollal, vagy a gyűjtés napján a lyse-no-wash protokollal.

Feldolgozott minták

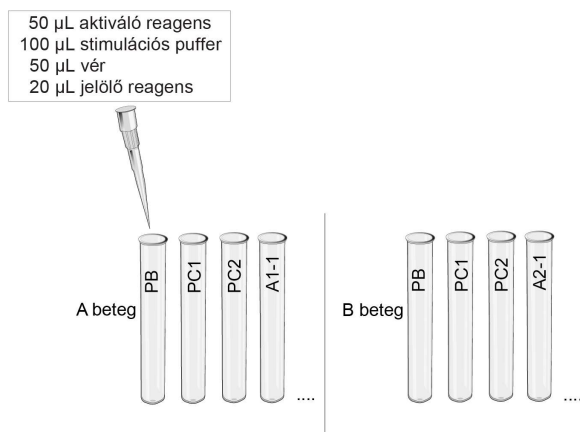
A standard protokoll szerint feldolgozott sejteket fixáljuk. A fixált sejtek 5 napig tárolhatók 2-8 °C-on fénytől védve a későbbi áramlási citometriás vizsgálatokhoz.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

1. A vérvételi cső többszöri megfordításával keverje össze az alvadásgátlóval kezelt vérmintát.
2. Készítsen elő új és pirogénmentes standard polipropilén vagy polisztirol áramlási citometriás csöveket.
3. Minden egyes beteg esetében címkézze fel a csöveket, pl. a következők szerint:
PB = a beteg alapjele
PC1 = stimulációs kontroll anti-FcεRI Ab-vel
PC2 = fMLP-vel történő stimulációs kontroll

A1-1 az 1. allergén esetében 1. hígítással

A1-2 az 1. allergénre a 2. hígítással stb.



Stimuláció és festés

- Adjunk 50 µL-t a megfelelő reagensből minden egyes csőbe:
PB cső: 50 µL **stimulációs puffer** (beteg alapjel)
PC1 cső: 50 µL **stimulációs kontroll** anti-FcεRI mAb
PC2 cső: 50 µL **stimulációs kontroll** fMLP
Ax-y cső: 50 µL **allergén**
- Adjunk 100 µL stimulációs puffert (STB) minden egyes csőbe.
- Adjunk 50 µL beteg teljes vért minden egyes csőbe. Ügyeljen arra, hogy a cső oldala és teteje mentes legyen a vértől.
- Óvatosan keverje össze.
- Adjunk 20 µL jelölő reagens (SR) minden egyes csőbe.
- Óvatosan keverjük össze, fedjük le a csöveket, és inkubáljuk 15 percig 37 °C-on **vízfürdőben**.

Megjegyzés: Ha vízfürdő helyett inkubátort használunk, az inkubációs idő a kevésbé hatékony hőátadás miatt 25 percre hosszabbodik.

Lizálás

Megjegyzés: A lizáló reagensnek szobahőmérsékletre (18-28 °C) kell melegednie.

Standard protokoll: Lizálás és mosás

- Adjunk 2 mL kiegyenlített (18-28 °C) lizáló reagenst minden egyes csőbe, és óvatosan keverjük össze.
- Inkubáljuk 5-10 percig 18-28 °C-on.
- Centrifugáljuk a csöveket 5 percig 500 x g-n.
- Öntsük le a felülúszót papírvatta segítségével.
- Reszuszpendálja a sejt pelletet 300 µL mosópufferrel (a mosópuffer tartalmaz fixálószerrel).

Megjegyzés: A mosópuffer mennyisége a használt áramlási citométerhez igazítható, a készülékkel kompatibilis holt térfogat és sejtsűrűség függvényében.

- Vortex-elje óvatosan.

Vagy 16a.mérje le a mintákat az áramlási citométeren.

Vagy 16b.ha nem azonnal méri le a mintákat, hagyja őket 30 percig inkubálni RT-n (szobahőmérséklet), fénytől védve (fixálás). A mintákat a mérésig tárolja lezártan és fénytől védve 2-8 °C-on. A fixált sejtek 5 napig 2-8 °C-on tárolhatók a későbbi áramlási citometriás méréshez. A mintacsöveket a mérés előtt óvatosan vortexelje.

Megjegyzés: A fixált minták előkezelés nélkül bármikor lemérhetőek. A tárolási időt lásd a "Minta gyűjtés és tárolás" című részben. Hosszabb tárolás után a fluoreszcencia intenzitásának enyhe csökkenése és alacsonyabb, ≥80%-os bazofil visszanyerés figyelhető meg.

Alternatív protokoll: Lyse-no-wash protokoll

Az új generációs, nagy teljesítményű áramlási citométerek képesek lizált, mosatlan minták elemzésére. Ezt az eljárást a használt áramlási citométer műszerhez kell igazítani, és optimalizálást igényelhet. Az alábbi protokoll Attune NxT áramlási citométerrel (Thermo Fisher) nyert adatokon alapul.

- Végezze el a vizsgálati eljárást (fenti) 1-9. lépéseit, majd folytassa a 10. lépéssel. Adjunk 1,5 ± 0,5 mL szobahőmérsékletű (18-28 °C) lizáló reagenst minden egyes csőhöz, és óvatosan keverjük össze (a mennyiséget a használt áramlási citométer felvételi sebességének függvényében kell optimalizálni).
- A minták felvétele nagy áteresztőképességű, megfelelő áramlási citométerrel, nagy felvételi sebességgel, hogy a mérési idő minimális maradjon.

Megjegyzés: A mintákat a minta beérkezésétől számított 24 órán belül elemezni kell. Kérjük, olvassa el a "Minta gyűjtés és tárolás" című részt.

ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI ADATGYŪJTÉS

Az áramlási citometriás mérés bármely 488 nm-es argon lézerdíódával (kék-zöld gerjesztő fény) működő áramlási citométerrel elvégezhető.

Az áramlási citométert úgy kell felszerelni, hogy képes legyen az előre szórás (FSC), az oldalszórás (SSC) és a két fluorokróm FITC és PE csatorna detektálására.

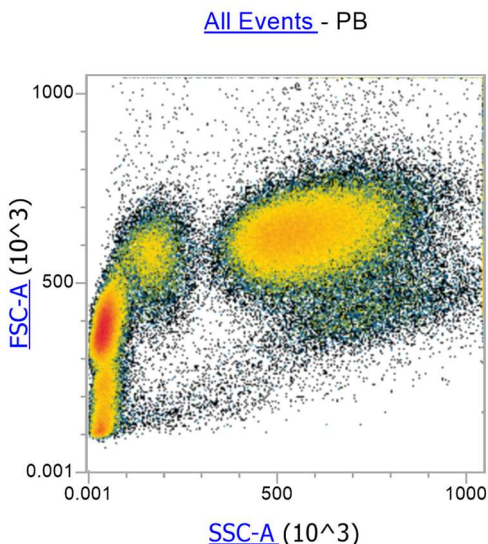
Győződjön meg arról, hogy az áramlási citométer megfelelően van beállítva, és a színkompenzáció be van állítva.

A nyugalmi és aktivált bazofilok megfelelő felvételéhez és méréséhez készítse el a következő pontdiagramot:

- Hozza létre az 1. pontdiagramot (Forward Scatter vs Side Scatter) a teljes leukocita-populáció felvételéhez az 1. ábrán látható módon. A minták mérése során győződjön meg arról, hogy a leukocita-populáció három különálló populációra (limfociták, monociták és granulociták) van elkülönítve az FSC/SSC pontdiagramon. Állítsa be az FSC és SSC jelek erősítését (gain), hogy az 1. ábrán látható eloszlást kapja. Az utasításokat lásd az áramlási citométer kézikönyvében.
- Hozza létre a 2. pontdiagramot, úgymint CCR3-PE vs Side Scatter a 2. ábrán látható módon. Állítson be egy kaput (pl. bazofilok), amely a teljes bazofil populációt tartalmazza, mint CCR3^{pos} és SSC^{low}, ahogyan az a 2. ábrán látható téglalap alakú kapuval látható. Az eozinofileket, amelyek szintén CCR3^{pos}, a magas SSC alapján ki kell zárni.
- Készítsen egy 3. pontdiagramot CD63-FITC vs. CCR3-PE formában, amely csak a gátolt bazofilokat mutatja, amint az a 3. ábrán látható. Használja a beteg alapjel (PB) cső nem stimulált, nyugalmi állapotban lévő bazofil sejtjeit egy kvadráns kapu beállításához, beleértve a CD63 negatív bazofil sejtet a jobb alsó kvadránsban (CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{low}), ahogyan az az alábbi ábrán látható. 3. ábra. A pozitív kontrollok és specifikus

allergének stimulálásával aktivált bazofilok a jobb felső kvadránsban azonosított CD63 pozitív bazofil populációt ($CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}$) eredményeznek, amint azt a 4. ábra mutatja a pozitív kontroll stimuláció (STCON) példájával.

A vizsgálat eredményét a CD63 pozitív bazofilok aránya az összes bazofilhoz viszonyítva (%CD63 aktiváció), ahogyan azt a 3. pontdiagram kvadráns kapujában bármelyik stimulációs cső esetében azonosították.



1. ábra: Három különálló populáció (limfociták, monociták és granulociták) egy FSC/SSC pontdiagramon.

Mérjen le legalább 500 vagy több bazofil sejtet mindegyik stimulációs mintánál (a 2. ábrán látható 2. pontdiagram szerint). Ha 300-nál kevesebb bazofil sejtet mértünk be (*pl.* bazopénia esetén), a vizsgálati eredmények nem értékelhetők.

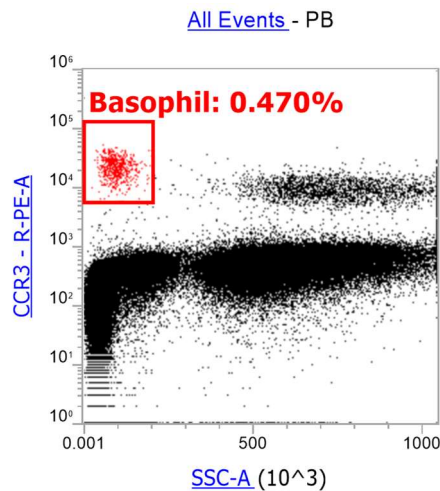
ADATELEMZÉS

A lemért adatokat a megfelelő áramlási citometriás elemző szoftverrel elemzik. Állítson be hasonló pontdiagramokat és kapukat, mint az adatgyűjtésnél.

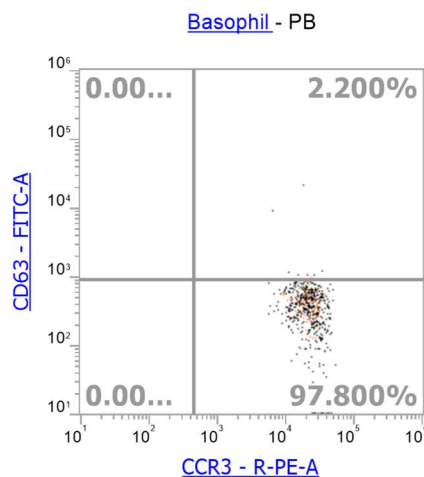
A 2. pontdiagramon a bazofilokat azonosító kapuk függetlenül használhatóak ugyanazon betegminta bármelyik különböző stimulációjánál.

Az eredmények helyes kiértékeléséhez és standardizálásához minden egyes beteg számára háttérbeállítást kell meghatározni a beteg alapjelének (PB) segítségével. A 3. pontdiagramon beállított kvadráns kaput meg kell határozni a PB-ben beállított beállítással. Az elemzés standardizálása érdekében a kapu beállítása 2 és 2,5% közötti aktivált bazofilok között történik minden egyes beteg PB-mintájában (lásd a 3. ábrát).

Ezt a kaput kell alkalmazni ugyanazon betegek minden további stimulációjára (PC1, PC2 és az összes mért allergén), hogy kiszámíthassuk a CD63 pozitív sejtek százalékos arányát bármely stimulációban (lásd a 4. ábrát).

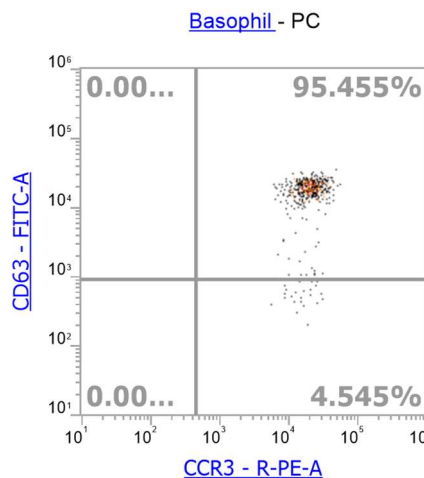


2. ábra: A bazofil sejtek kiválasztása $CCR3^{pos} / SSC^{low}$



Kapuzott terület	Szám (n=)	%
Összesen	125'864	100,0
Basophil	591	0,47
Q2 ($CD63^{pos}$)	13	2,2
Q4 ($CD63^{neg}$)	578	97,8

3. ábra: A beteg alapjele (PB) csak STB-vel



Kapuzott terület	Szám (n=)	%
Összesen	130'926	100,0
Basophil	506	0,39
Q2 ($CD63^{pos}$)	483	95,5
Q4 ($CD63^{neg}$)	23	4,5

4. ábra: Stimulációs kontroll (STCON)

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

A következő kritériumoknak és minőségellenőrzési pontoknak kell megfelelniük az elfogadható eredményhez:

Leukocita populációk: Az FSC/SSC ábrán jellemzően három különböző leukocita-populációnak, a limfocitáknak, a monocitáknak és a granulocitáknak kell megjelennie (lásd az 1. ábrát). Előfordulásuk a vérminta minőségének kritériumának tekinthető (a mintagyűjtés és a vizsgálat elvégzése közötti idő keret, tárolási körülmények). A teszteredmények nem értékelhetők, ha 300-nál kevesebb bazofil található.

Stimulációs (pozitív) kontrollok anti-FcεRI mAb és fMLP: Az anti-FcεRI mAb az allergén által *in vivo* okozott receptor keresztlinket szimulálja. Az fMLP egy tripeptid, amely nem immunológiai módon bazofil aktivációt okoz.

- Ha az anti-FcεRI mAb kontroll $\geq 10\%$ -os aktivált bazofil értéket mutat, a minták értékelhetők.
- Ha csak az fMLP-kontroll mutat $\geq 10\%$ -os jelet, de az anti-FcεRI mAb nem, akkor a vizsgálatot helyesen hajtották végre, de a teszteredmények nem értékelhetők. A beteg IgE-re nem reagálnak minősül.
- Ha mind az anti-FcεRI mAb, mind az fMLP $<10\%$ -os aktivált bazofil értékeket mutat, akkor valószínűleg technikai hiba történt. A vizsgálati eredményt érvénytelennek kell tekinteni, és a vizsgálatot meg kell ismételni.

STANDARDIZÁLÁS

A Flow CAST® a CD63 sejtfelszíni markert expresszáló bazofilok populációját mutatja ki az összes bazofil százalékában. Erre az analitre nincsenek nemzetközileg vagy nemzeti szinten elismert referenciaanyagok vagy referencia mérési eljárások.

A tételek közötti reprodukálhatóságot az anti-CD63-FITC és az anti-CCR3-PE monoklonális antitest konjugátumok kalibrációs gyöngyökkel szembeni titrálása garantálja. A tételek közötti eltérés becsléséhez kérjük, tekintse meg a reprodukálhatósági eredményeket a "Teljesítményjellemzők" részben.

KORLÁTOZÁSOK

- A Flow CAST® vizsgálati eredményeket más klinikai és laboratóriumi eredményekkel együtt kell értelmezni.
- A gyógyszerekkel összefüggő allergiás rendellenességek meghatározásához a BAT-vizsgálatot az allergiás reakciót követő 6 hónapon belül kell elvégezni (ref. 8).
- A BAT-vizsgálat elvégzése előtt legalább egy-két hétnek el kell telnie az allergiás reakciót követően (ref. 8).
- A gyógyszerallergénekre kapott negatív eredmények nem használhatók fel az allergia kizárására.
- Várhatóan a betegek 5-10%-a nem válaszol az IgE-re. Ezeknél a betegeknél a CD63 expressziójának növekedése és pozitív eredmény nem lesz megfigyelhető. A nem válaszolók a Flow CAST® teszthez mellékelt stimulációs kontrollok segítségével azonosíthatók (ref. 9).
- A nem megfelelően (félig töltöttnél kevesebbre) töltött K-EDTA vérvételi csövek hamis negatív eredményt adhatnak.

- Az omalizumab (XOLAIR®) kezelés alatt álló betegeknél várhatóan interferencia lép fel a Flow CAST® vizsgálati eredményekkel (ref. 10).
- A vérvétel előtt legalább 24 órával kerülni kell a szisztémásan alkalmazott antiallergén gyógyszereket, például kortikoszteroidokat, kromoglikonsavat (DSCG).

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Flow CAST® eredménykategóriák a következők:

Eredmény	Interpretálás
< határérték	negatív
\geq határérték az allergén egyik vagy mindkét hígítására.	pozitív

3. táblázat

HATÁRÉRTÉK ÉS REFERENCIA INTERVALLUM

A technikai határértéket 5%-ban aktivált bazofiloknál állapították meg, ahol az $\geq 5\%$ CD63^{pos} eredmény bazofil aktivációt jelez.

Minden egyes allergén esetében a BÜHLMANN allergén fűzetekben megadott allergén specifikus határértékek használatával javul a mérés specificitása.

A referenciaintervallumokat a CLSI C28-A3 szabvány szerint állapították meg. Egy véradóközpontból származó százhusz (120) vérmintát stimuláltak stimulációs pufferral vagy anti-FcεRI mAb-vel, és a standard és lyse-no-wash protokollok szerint vizsgálták. A vizsgálatokat 26 napon keresztül három operátor végezte két Flow CAST® reagens tétellel.

Kontroll	Vizsgálati protokoll	Referenciaintervallum (90% CI) [% CD63 ^{pos}]	
		2,5. percentilis	97,5. percentilis
Stimulációs puffer	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-FcεRI 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)

4. táblázat

KLINIKAI TELJESÍTMÉNY

A Flow CAST® klinikai teljesítményét a szakirodalom szisztematikus áttekintése során értékelték. Az elemzésbe tizenegy, a 2019 novemberéig tartó időszakra kiterjedő szisztematikus irodalmi keresés során azonosított, lektorált tanulmányt, egy, az eredeti keresés során nem azonosított, rovarméregről szóló tanulmányt és két, 2019 után megjelent, mogyoróallergénről szóló tanulmányt vontak be. A tanulmányok azt vizsgálták, hogy a Flow CAST® képes-e különbséget tenni az allergiás és a nem allergiás alanyok között. Az allergiás alanyoknál az allergiás rendellenességeket vagy a) a beteg klinikai anamnézisével, b) orális élelmiszer-kihívással (OFC) vagy provokációs teszttel, c) klinikai anamnézissel és laboratóriumi vizsgálatokkal (bőrprick - SPT, sIgE) vagy d) klinikai anamnézissel és OFC/ provokációs teszttel igazolták. A sIgE-t vagy SPT-t kizárólagos klinikai referenciaként alkalmazó vizsgálatokat kizárták. Az eredményeket az 5. táblázat foglalja össze.

Allergén csoport	N tanulmányok	Érzékenység medián (tartomány)	Allergiás alanyok (összesen)	Specifitási medián (tartomány)	Kontrollalanyok (összesen)
Élelmiszerek Inhalációs szerek	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Rovar mérgek	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Drogok	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

5. táblázat

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

Laboratóriumon belüli pontosság: $\leq 25\%$ CV stimulus esetében

A megismételhetőséget (mérésen belüli) és a laboratóriumon belüli pontosságot a CLSI EP05-A3 iránymutatása és az ISO 15197:2013 szabvány alapján állapították meg. Négy donorvérmintát stimuláltunk stimulációs pufferrel vagy stimulációs kontroll anti-Fc ϵ RI mAb-vel. A standard eljáráshoz 2 operátor x 4 nap x 1 futtatás x 4 ismétlés vizsgálati tervet alkalmaztunk. A lyse-no-wash eljáráshoz 2 operátor x 1 nap x 4 futás x 4 ismétlés vizsgálati tervet alkalmaztak. Egy ismétlés egy független stimulációs reakciónak és egy teljes vizsgálati eljárásnak felel meg. A stimulációs kontroll anti-Fc ϵ RI mAb eredményeit a 6. táblázat foglalja össze.

Vizsgálati protokoll	Donor	Átlag [%CD63]	n	Futáson belül [%CV]	Napon belül (A) Futás között (B) [%CV]	Összesen [%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%

6. táblázat

Reprodukálhatóság: $\leq 25\%$ CV az ingereknél

A reprodukálhatóságot a CLSI EP05-A3 iránymutatása és az ISO 15197:2013 szabvány alapján állapították meg. Négy donorvérmintát stimuláltunk stimulációs pufferrel vagy stimulációs kontroll anti-Fc ϵ RI mAb-vel. A mintákat két laboratóriumi helyszínen vizsgálták a standard protokoll szerint. 3 műszer/tétel x 2 operátor x 1 nap x 5 ismétléses vizsgálati tervet alkalmaztunk. Egy ismétlés egy független stimulációs reakciónak és egy teljes vizsgálati eljárásnak felel meg. A stimulációs kontroll anti-Fc ϵ RI mAb eredményeit a 7. táblázat foglalja össze.

Donor	Átlag [%CD63]	n	Futáson belül [%CV]	Operátorok közötti [%CV]	A tételek/ műszerek között [%CV]	Összesen [%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%

7. táblázat

ZAVARÓ ANYAGOK

A Flow CAST® vizsgálat gyógyszerekkel, rendellenes vér kondíciókkal és a K-EDTA adalékkal szembeni érzékenységét a CLSI EP07-A2 iránymutatásának megfelelően értékelték. Az eredmények 20%-ot meghaladó torzítása a stimulációs kontroll anti-Fc ϵ RI mAb és 20%-ot meghaladó CD63^{pos} (abszolút) a stimulációs kontroll fMLP esetében interferenciának minősült. A 8. táblázatban felsorolt anyagokkal a megadott koncentrációkban nem észleltek interferenciát. Interferenciát észleltek a K-EDTA-vérvételi cső kétszeres K-EDTA koncentrációjánál egy donor esetében.

Aktív komponens	Vizsgálati koncentráció [μ g/mL]
Fexofenadin-hidroklorid	1,6
Cetirizin-dihidroklorid	4,35
Hidroxizin-dihidroklorid	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednizon	1,2
N-Acetil-L-tryptofán	30
Triglicerid (Intralipid)	20'000
Bilirubin konjugált	400
Bilirubin nem konjugált	400
Hemolízis	56'100

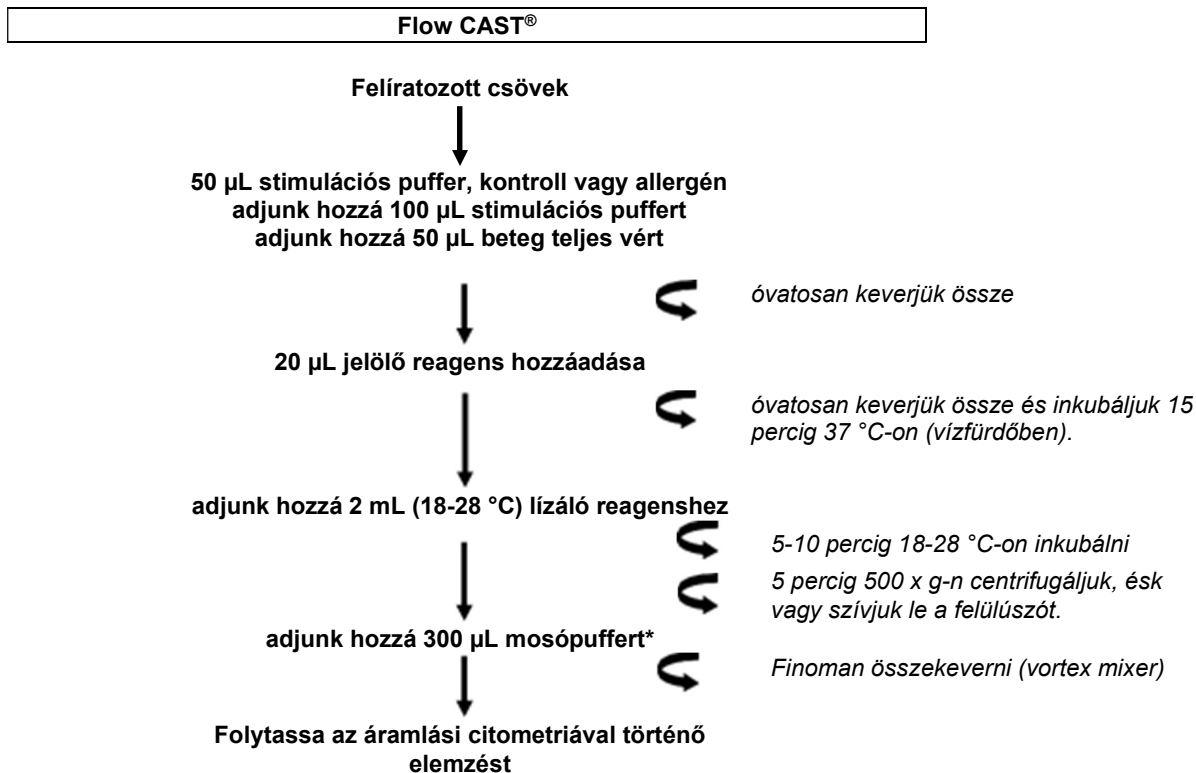
8. táblázat

REFERENCIÁK

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. Ugucconi, 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).

RÖVID PROTOKOLL

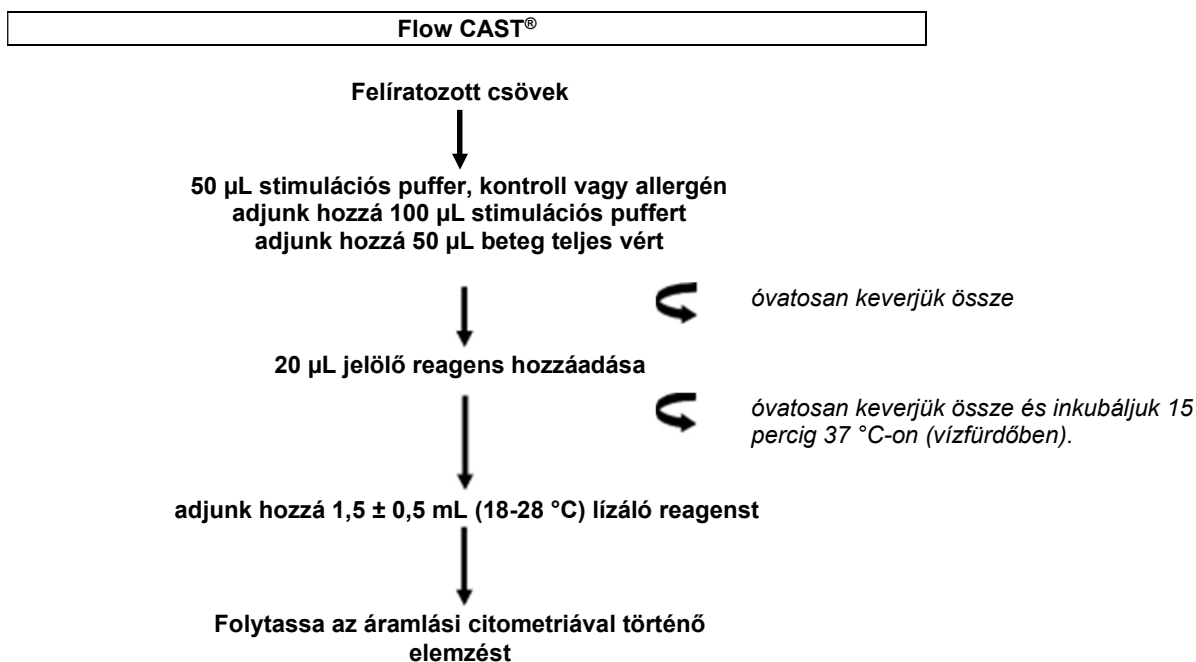
STANDARD PROTOKOLL: LIZÁLÁS ÉS MOSÁS



ÖSSZEMÉRÉSI IDŐ ~30 PERC / EREDMÉNYIG TARTÓ IDŐ: ~ 1 ÓRA

* Megjegyzés: Az alkalmazott áramlási citométer műszerektől függően a mosópuffer mennyiségét a műszerrel kompatibilis holt térfogat és sejtsűrűség alapján kell meghatározni.

ALTERNATÍV PROTOKOLL: LYSE-NO-WASH PROTOKOLL



ÖSSZEMÉRÉSI IDŐ: ~ 20 PERC/ AZ EREDMÉNY ELÉRÉSÉHEZ SZÜKSÉGES IDŐ: ~ 1 ÓRA

VÁLTOZÁSI NAPLÓ

Dátum	Verzió	Változás
2023-06-21	A2	Az <i>Adatelemzés és a Klinikai teljesítmény</i> fejezet átfogalmazása A bejelentett szervezet számának feltüntetése a CE-jelölésen - az IVDR 2017/746 szerinti megfeleléseértékelési eljárás

ESEMÉNYEK JELENTÉSE AZ EU TAGÁLLAMOKBAN

Ha az eszközzel kapcsolatban bármilyen súlyos esemény történt, kérjük, haladéktalanul jelezze a tagállam gyártójának és illetékes hatóságának.

SZÁLLÍTÁSI KÁROK

Kérjük, értesítse a forgalmazót, ha ezt a terméket sérülten kapta.

SZIMBÓLUMOK

A BÜHLMANN az ISO 15223-1 szabványban felsorolt és leírt szimbólumokat és jeleket használja. Ezenkívül a következő szimbólumokat és jeleket használják:

Szimbólum	Magyarázat
BUF STIM	Stimulációs puffer
CONTROL STIM	Stimulációs kontroll
CONTROL FMLP	Stimulációs kontroll fMLP
REAG STAIN	Jelölő reagens
REAG LYS	Lízáló reagens
BUF WASH	Mosópuffer

