



Flow CAST[®]

Test Aktywacji Bazofilów (BAT) Cytometria przepływowa

Do diagnostyki *in vitro*

FK-CCR 100 testów

Data wydania: 2023-06-21
Wersja A2

 **Producent**

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

PRZEZNACZENIE

BÜHLMANN Flow CAST® jest testem do diagnostyki *in vitro* służącym do jakościowej oceny aktywacji bazofilów po stymulacji specyficznymi alergenami. Test wykorzystuje cytometrię przepływową do określania populacji bazofilów wykazujących ekspresję markera powierzchniowego CD63 w próbkach krwi pełnej K-EDTA pacjentów. Flow CAST® jest przeznaczony jako pomoc w diagnozowaniu zaburzeń alergicznych typu natychmiastowego w połączeniu z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych. Tylko do użytku laboratoryjnego.

ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Flow CAST® to oparty na cytometrii przepływowej test aktywacji bazofilów (ref. 1, 2). Krew pełna pacjentów jest stymulowana specyficznymi alergenami, jak również buforem stymulacji i kontrolami stymulacji w celu oceny degranulacji bazofilów pacjenta *ex vivo*. Próbka jest barwiona przy użyciu dwóch fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał monoklonalnych: jednego do selekcji bazofilów (anty-CCR3-PE) i jednego do określenia stanu aktywacji bazofilów (anty-CD63-FITC) (ref. 3-6). CD63 jest białkiem transmembranowym obecnym na pęcherzykach wewnątrzkomórkowych i prezentowanym na powierzchni komórek dopiero po degranulacji bazofilów (ref. 7). Erytrocyty z próbki pacjenta są usuwane w reakcji lizy. W zależności od protokołu, komórki są odwirowywane, ponownie zawieszane w buforze płuczącym i utrwalane do późniejszej analizy za pomocą cytometrii przepływowej lub analizowane bezpośrednio po lizie. Bazofile są bramkowane z populacji leukocytów jako CCR3^{pos}/SSC^{low}. Status aktywacji bramkowanych bazofilów jest określany przez ich ekspresję CD63 (marker aktywacji). Pacjenci, którzy nie wywołują odpowiedzi alergicznych za pośrednictwem IgE, tak zwani niereagujący, są identyfikowani na podstawie wyników kontroli pozytywnych. Odczyt testu jest wskazywany jako stosunek bazofilów CD63 dodatnich do wszystkich bazofilów (% aktywacji CD63).

DOSTARCZONE ODCZYNNIKI I ICH PRZYGOTOWANIE

Odczynniki	Ilość	Kod	Komentarze
Bufor Stymulacji zawierający wapń, heparynę i IL-3	1 zliofilizowana na fiolka	B-CCR-STB	Rekonstruowana z 50 mL wody ¹⁾
Kontrola Stymulacji anty-FcεRI mAb	1 zliofilizowana na fiolka	B-CCR-STCON	Rekonstruowana z 1,5 mL B-CCR-STB
Kontrola Stymulacji fMLP ²⁾	1 zliofilizowana na fiolka	B-CCR-FMLP	Rekonstruowana z 1,5 mL B-CCR-STB
Odczynnik barwiący Mieszanina anty-CD63-FITC i anty-CCR3-PE mAb	1 fiolka 2,2 mL	B-CCR-SR	Gotowy do użycia
Odczynnik Lizujący ³⁾ 10x stężony	1 fiolka 25 mL	B-CCR-LYR	Rozcieńczyć z 225 mL wody dejonizowanej
Bufor płuczący z 0.1% formaldehydu	1 fiolka 100 mL	B-CCR-WB	Gotowy do użycia

Tabela 1

¹⁾ Informacje na temat wymaganej jakości wody znajdują się w rozdziale Techniczne środki ostrożności

²⁾ N-formylo-metionylo-leucylo-feniloalanina

³⁾ Podczas przechowywania w temperaturze 2-8°C mogą tworzyć się kryształy, które przed rozcieńczeniem należy rozpuścić w temperaturze 18-28°C

PRZECHOWYWANIE I TRWAŁOŚĆ ODCZYNNIKÓW

Zamknięte odczynniki	
Przechowywać w 2-8 °C. Nie używać odczynników po upływie daty ważności wydrukowanej na etykietach.	
Otwarte odczynniki i rekonstruowane odczynniki	
Bufor Stymulacji	Stabilny w temperaturze -20°C przez 6 miesięcy. Podzielić na porcje, jeżeli spodziewane jest wielokrotne użycie.
Kontrola Stymulacji	
Kontrola Stymulacji fMLP	
Odczynnik Lizujący	Stabilny w temperaturze 2-8°C przez 6 miesięcy.
Odczynnik barwiący	
Bufor płuczący	

Tabela 2

NIEZBĘDNE MATERIAŁY, KTÓRE NIE ZOSTAŁY DOSTARCZONE

- Probówki do poboru krwi żyłnej z K-EDTA
- Wirówka
- Jednorazowe, wolne od pirogenów polipropylenowe lub polistyrenowe probówki do cytometrii przepływowej
- Statywy na probówki do cytometrii przepływowej do stymulacji
- Wytrząsarka Vortex
- (Opcjonalnie) płytki do mikromiareczkowania do hodowli tkankowej do stymulacji i barwienia komórek w protokole standardowym
- (Opcjonalnie) płytki głębokodołkowe do stymulacji komórek, barwienia, lizy i akwizycji cytometrii przepływowej dla protokołu lizy bez płukania
- Precyzyjne pipety z jednorazowymi, wolnymi od pirogenów końcówkami:
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - 1-5 mL regulowana pipeta i
 - Opcjonalnie: 10-50 µL regulowany dozownik
- 50 mL cylinder do rekonstrukcji buforu stymulacji
- Sterylna, ultraczysta i apirogenna woda do rekonstrukcji buforu stymulacji (odnieść się do rozdziału Techniczne środki ostrożności)
- Łażnia wodna (zalecana) lub inkubator ustawiony na 37°C
- Woda destylowana lub dejonizowana oraz odpowiednie szkło laboratoryjne do rozcieńczania odczynnika lizującego
- Wieczka lub folia parafilmowa do przykrycia probówek podczas etapów inkubacji
- Dozowniki butelkowe do odczynnika lizującego i buforu płuczającego
- Cytometr przepływowy wyposażony w źródło lasera 488 nm (niebieskie) oraz filtry emisyjne do detekcji PE i FITC
- Oprogramowanie do analizy cytometrii przepływowej (odnieść się do rozdziału Pozyskiwanie danych cytometrii przepływowej)

ALERGENY ZAMAWIANE ODDZIELNIE

Alergeny zwalidowane dla Flow CAST® są oferowane oddzielnie przez firmę BÜHLMANN. Kody zamówień alergenów oraz informacje na temat przygotowania alergenów można znaleźć w broszurach dotyczących alergenów BÜHLMANN na stronie internetowej BÜHLMANN:

www.buhmannlabs.ch/

Ważne: Flow CAST® został przetestowany wyłącznie w połączeniu z zestawem CAST® Allergens dostępnym w BÜHLMANN Laboratorios AG. Wyłączną odpowiedzialność za zatwierdzenie użycia alergenów uzyskanych z innych źródeł ponosi laboratorium.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Środki ostrożności

- Bufor Stymulacji (B-CCR-STB) tego testu zawiera składniki pochodzenia ludzkiego. Mimo że testy dały wynik negatywny na obecność antygenów powierzchniowego HBV, HCV i przeciwciał HIV1/2, z odczynnikami należy obchodzić się tak, jakby mogły przenosić infekcje i zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP), stosując odpowiednie środki ostrożności.
- Unikać kontaktu ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu, natychmiast przemyć dużą ilością wody.
- Odczynniki i chemikalia muszą być traktowane jako odpady niebezpieczne zgodnie z krajowymi wytycznymi lub przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.

Techniczne środki ostrożności

- Zalecana jakość wody dla Flow CAST®: Użycie sterylnej, ultraczystej i apirogennej wody do rekonstrukcji buforu stymulacji (B-CCR-STB) jest niezbędne do dobrej i powtarzalnej stymulacji bazofilów. Można stosować następujące źródła wody: woda do hodowli komórkowych, woda do infuzji lub dejonizowana, podwójnie destylowana woda, która jest ultrafiltrowana w okresowo dezynfekowanym ultrafiltrze 10 kDa.
- Odczynnik lizujący (B-CCR-LYR) można rekonstruować za pomocą dejonizowanej, podwójnie destylowanej wody lub wody o tej samej jakości, która jest używana do rekonstrukcji buforu stymulacji.
- Należy unikać zanieczyszczenia alergenami podczas stymulacji komórek: Aeroalergeny w laboratorium mogą zanieczyścić otwarte próbki krwi i zawiesiny komórek, powodując podwyższone tło. Próbki krwi i próbki do stymulacji komórek muszą być starannie przykryte wieczkami lub folią parafilmową. Należy unikać roztoczy kurzu domowego, roślin zapylających, rękawic lateksowych lub sprzętu potencjalnie zawierającego lateks, a także otwartych okien w laboratorium, w którym przeprowadzana jest stymulacja komórek. Zaleca się przeprowadzanie etapów przygotowania i stymulacji komórek w komorze laminarnej.
- Łażnia wodna jest zalecana w porównaniu do inkubatora, ze względu na bardziej efektywny transfer ciepła. W przypadku korzystania z inkubatora należy sprawdzić, czy temperatura wynosi 37°C. Niższe lub wyższe temperatury mogą mieć wpływ na wyniki.
- Generalnie oczekiwany jest niski poziom aktywacji bazofilów dla alergenów lekowych. Dlatego kluczowe jest osiągnięcie optymalnych warunków podczas stymulacji, w tym temperatury. W przypadku alergenów lekowych zaleca się stosowanie pojedynczych próbek zamiast płytek głębokodołkowych.
- Nie wolno używać składników po upływie daty ważności wydrukowanej na etykietach.
- Nie mieszać różnych partii odczynników.
- Unikać zanieczyszczenia odczynników.

Procedura testowa

- Doprowadzić odczynnik lizujący do temperatury pokojowej (18-28 °C).
- Przed wykonaniem testu należy uważnie przeczytać instrukcję. Nieprawidłowe rozcieńczenie odczynników, obchodzenie się z nimi lub przechowywanie ich w warunkach innych niż określone w niniejszej instrukcji użytkowania, będzie miało negatywny wpływ na wydajność testu.
- Niewłaściwe obchodzenie się z próbkami może powodować niedokładne wyniki.
- Zweryfikować preparaty wzrokowo, aby ocenić skuteczność lizy. Erytrocyty mogą być niecałkowicie poddane lizie i pojawić się na wykresie punktowym dyfrakcji światła w tym samym miejscu co leukocyty.
- Wydłużony czas lizy może prowadzić do utraty komórek. Upewnij się, że masz co najmniej 300 bazofilów do akwizycji danych. Zalecamy, aby akwizycja próbek przetworzonych za pomocą protokołu lizy bez płukania została przeprowadzona w ciągu godziny.
- Cytometria przepływowa może dawać fałszywe wyniki jeśli: cytometr jest źle ustawiony, emisja fluorescencji nie została odpowiednio skompensowana, obszary bramkowania nie zostały starannie ustawione.

POBIERANIE PRÓBEK I ICH PRZECHOWYWANIE

Zaleca się, aby pacjenci unikali ogólnoustrojowo podawanych leków przeciwalergicznymi, takich jak kortykosteroidy, kwas chromoglikanowy (DSCG) przez co najmniej 24 godziny przed pobraniem krwi.

Pobrać krew do **próbek do poboru krwi żyłnej z K-EDTA**, napełniając próbki do oznaczonej objętości. Probówki muszą być wypełnione co najmniej do połowy. Jeden (1) mL krwi pełnej wystarcza na około 18 próbek.

Nie wirować ani nie mrozić próbek krwi.

Krew pełna

Próbki krwi pełnej przechowywane w temperaturze 2-8 °C powinny zostać zbadane w ciągu 48 godzin od pobrania.

W celu określenia zaburzeń alergicznych na leki zaleca się zbadanie próbek natychmiast i nie później niż 24 godziny po ich pobraniu.

Próbki krwi pełnej mogą być również trzymane w temperaturze pokojowej (temperatury do 28 °C). Muszą być jednak przebadane w ciągu 24 godzin od pobrania przy użyciu standardowego protokołu lub w dniu pobrania przy użyciu protokołu lizy bez płukania.

Zbadane próbki

Komórki badane przy użyciu standardowego protokołu są utrwalane. Utrwalone komórki mogą być przechowywane w temperaturze 2-8 °C przez 5 dni chronione przed światłem w celu późniejszej akwizycji za pomocą cytometrii przepływowej.

PROCEDURA TESTOWA

1. Wymieszać antykoagulowaną próbkę krwi poprzez kilkukrotne odwrócenie próbki do poboru krwi żyłnej.
2. Przygotować świeże i wolne od pirogenów standardowe polipropylenowe lub polistyrenowe próbki do cytometrii przepływowej.
3. Dla każdego pacjenta należy oznaczyć próbki, np. w następujący sposób:

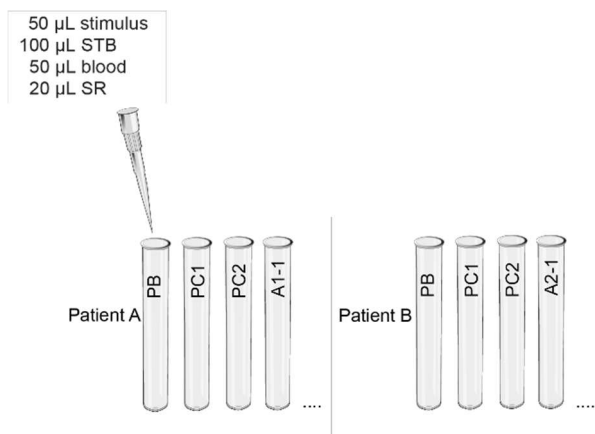
PB = tło pacjenta

PC1 = kontrola stymulacji z przeciwciałem anti-FcεRI

PC2 = kontrola stymulacji z fMLP

A1-1 dla alergenu 1 przy rozcieńczeniu 1

A1-2 dla alergenu 1 przy rozcieńczeniu 2 itd.



Stymulacja i barwienie

4. Dodać 50 µL odpowiedniego stymulanta do każdej probówki:
Probówka PB: 50 µL **buforu stymulacji** (tło pacjenta)
Probówka PC1: 50 µL **kontroli stymulacji** anti-FcεRI mAb
Probówka PC2: 50 µL **kontroli stymulacji** fMLP
Probówka Ax-y: 50 µL **alergenu**
5. Dodać 100 µL buforu stymulacji (STB) do każdej probówki.
6. Dodać 50 µL krwi pełnej pacjenta do każdej probówki. Należy się upewnić, czy boki i górna część probówki są wolne od krwi.
7. Delikatnie wymieszać.
8. Dodać 20 µL odczynnika barwiącego (SR) do każdej probówki.
9. Delikatnie wymieszać, przykryć probówki i inkubować przez 15 minut w temperaturze 37°C w **łaźni wodnej**.

Uwaga: Jeżeli wykorzystano inkubator zamiast łaźni wodnej, czas inkubacji jest wydłużony do 25 minut z powodu mniej wydajnego transferu ciepła.

Liza

Uwaga: Odczynnik lizujący musi być doprowadzony do temperatury pokojowej (18-28 °C).

Protokół standardowy: Liza i płukanie

10. Dodać 2 mL zrównoważonego (18-28°C) odczynnika lizującego do każdej probówki, delikatnie wymieszać.
11. Inkubować przez 5-10 minut w temperaturze 18-28°C.
12. Wirować probówki przez 5 minut przy obrotach 500 x g.
13. Zlać supernatant przy wykorzystaniu bibuły.
14. Zawiesić osad komórkowy w 300 µL buforu płuczającego (bufor płuczający zawiera utrwalcacz).

Uwaga: Ilość buforu płuczającego może być dostosowana do konkretnego używanego oprzyrządowania cytometru przepływowego, zgodnie z objętością martwą i gęstością komórek zgodną z urządzeniem.

15. Wymieszać delikatnie przy użyciu wytrząsarki Vortex.

16a. Zbadanie próbek w cytometrze przepływowym.

LUB 16b. Jeśli próbki nie zostały poddane bezpośredniej analizie należy je inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej i chronić przed światłem (utrwalenie). Przechowywać próbki szczelnie zamknięte i chronić przed światłem w temperaturze 2-8°C do czasu pomiaru. Utrwalone komórki mogą być przechowywane w temperaturze 2-8 °C przez 5 dni w celu późniejszej akwizycji za pomocą cytometrii przepływowej. Przed akwizycją należy delikatnie wymieszać probówki z próbkami za pomocą wytrząsarki Vortex.

Uwaga: Przechowywane utrwalone próbki mogą być pozyskiwane bez wstępnej obróbki w dowolnym momencie. Informacje na temat czasu przechowywania znajdują się w rozdziale "Pobieranie próbek i ich przechowywanie". Po dłuższym przechowywaniu można zaobserwować niewielki spadek intensywności fluorescencji i niższy odzysk bazofilów ≥80%.

Protokół alternatywny: protokół lizy bez płukania

Wysokowydajne cytometry przepływowe nowej generacji mogą analizować poddane lizie, niemyte próbki. Procedura ta musi być dostosowana do używanego oprzyrządowania cytometru przepływowego i może wymagać optymalizacji. Poniższy protokół opiera się na danych uzyskanych za pomocą cytometru przepływowego Attune NxT (Thermo Fisher).

10. Wykonać etapy od 1 do 9 (powyżej) procedury testu, a następnie przejść do kroku 10 tutaj. Dodać 1,5 ± 0,5 mL zrównoważonego (18-28°C) odczynnika lizującego do każdej probówki, wymieszać delikatnie (objętość musi być zoptymalizowana w zależności od szybkości akwizycji używanego cytometru przepływowego).
11. Pobrać próbki za pomocą odpowiedniego cytometru przepływowego o dużej przepustowości z dużą szybkością akwizycji, aby skrócić czas analizy do minimum.

Uwaga: Próbkę należy poddać analizie w ciągu 24 godzin od ich otrzymania. Odnieść się do rozdziału "Pobieranie próbek i ich przechowywanie".

AKWIZYCJA DANYCH CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ

Akwizycję danych cytometrii przepływowej można prowadzić na dowolnym cytometrze przepływowym wyposażonym w argonową diodę laserową przy 488 nm (niebiesko-zielone światło wzbudzenia).

Cytometr przepływowy musi być wyposażony w rozproszenie przednie (FSC), rozproszenie boczne (SSC) i dwa fluorochromy - FITC i kanały PE.

Należy upewnić się, że cytometr przepływowy jest prawidłowo wyregulowany i jest ustawiona kompensacja koloru.

W celu odpowiedniego pozyskania i scharakteryzowania spoczynkowych i aktywowanych bazofilów należy utworzyć następujący wykres punktowy:

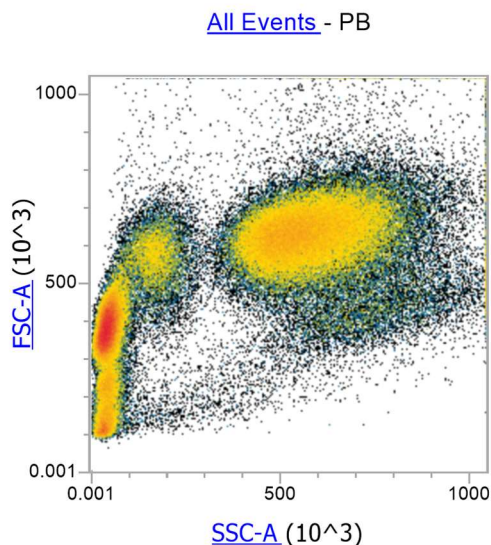
1. Utworzyć wykres punktowy 1, rozproszenie przednie vs rozproszenie boczne, aby uzyskać całą populację leukocytów, jak pokazano na rycinie 1. Podczas pobierania próbek należy upewnić się, że populacja leukocytów jest podzielona na trzy odrębne populacje (limfocyty, monocyty i granulocyty) na wykresie punktowym FSC/SSC. Dostosować wzmacnienie

(przyrost) sygnałów FSC i SSC, aby uzyskać rozkład podobny do rozkładu przedstawionego na rycinie 1. Więcej informacji można znaleźć w instrukcji cytometru przepływowego.

2. Utworzyć wykres punktowy 2, CCR3-PE vs rozproszenie boczne, jak pokazano na rycinie 2. Ustawić bramkę (np. bazofile) obejmującą całą populację bazofilów jako CCR3^{pos} i SSC^{low} jak pokazano na prostokątnej bramce na rycinie 2. Eozynofile, które są również CCR3^{pos}, muszą zostać wykluczone na podstawie wysokiego SSC.
3. Utworzyć wykres punktowy 3, CD63-FITC vs CCR3-PE, ukazujący tylko bramkowane bazofile, jak pokazano na rycinie 3. Użyć niestymulowanych, spoczynkowych bazofilów z próbki tła pacjenta (PB), aby ustawić bramkę kwadrantową obejmującą CD63 ujemne komórki bazofilów w prawym dolnym kwadrancie (CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{low}), jak pokazano na rycinie 3. Bazofile aktywowane przez stymulację pozytywnymi kontrolami i specyficznymi alergenami spowodują powstanie populacji bazofilów CD63 dodatnich (CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}) zidentyfikowanych w prawym górnym kwadrancie, jak pokazano na rycinie 4 z przykładem stymulacji pozytywną kontrolą (STCON).

Odczyt testu jest wskazany jako stosunek bazofilów CD63 dodatnich do wszystkich bazofilów (% aktywacji CD63) zidentyfikowanych w kwadrancie bramki wykresu punktowego 3 dla dowolnej próbki stymulacyjnej.

W celu prawidłowej oceny i standaryzacji wyników dla każdego pacjenta definiowane jest ustawienie tła przy użyciu stymulacji tła pacjenta (PB). Bramka kwadrantu ustawiona na wykresie punktowym 3 musi być zdefiniowana na PB. W celu standaryzacji analizy, bramkowanie jest ustawione od 2 do 2,5 % aktywowanych bazofilów w próbce PB każdego pacjenta (odnieść się do Ryciny 3). Bramka ta musi być zastosowana do wszystkich kolejnych stymulacji u tych samych pacjentów (PC1, PC2 i wszystkie zmierzone alergeny) w celu obliczenia odsetka komórek CD63 dodatnich w każdej stymulacji (odnieść się do Ryciny 4).

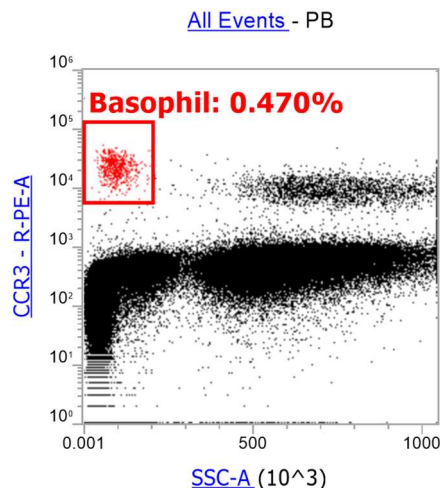


Rycina 1: Trzy odrębne populacje (limfocyty, monocyty i granulocyty) na wykresie punktowym FSC/SSC.

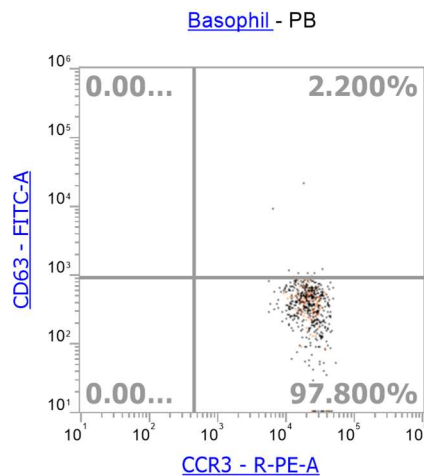
Uzyskać 500 lub więcej komórek bazofilnych dla każdej próbki stymulacyjnej (bramkowanej jak pokazano na wykresie punktowym 2, rycina 2 poniżej). Jeżeli uzyskano mniej niż 300 komórek bazofilnych (np. w przypadku bazopenii), nie można ocenić wyników testu.

ANALIZA DANYCH

Uzyskane dane są analizowane za pomocą odpowiedniego oprogramowania do analizy cytometrii przepływowej. Ustawić podobne wykresy punktowe i bramki, jak w przypadku akwizycji. Bramki identyfikujące bazofile na wykresie punktowym 2 mogą być niezależnie dostosowywane w dowolnej z różnych stymulacji dla tej samej próbki pacjenta.

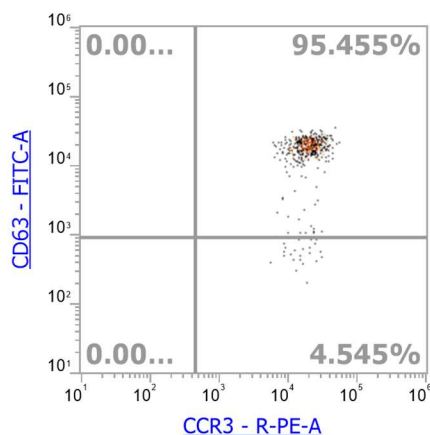


Rycina 2: Selekcja komórek bazofilnych CCR3^{pos} / SSC^{low}



Region bramkowy	Liczba (n=)	%
Suma	125'864	100,0
Bazofil	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{neg})	578	97,8

Rycina 3: Tło pacjenta (PB) tylko z STB



Region bramkowy	Liczba (n=)	%
Suma	130'926	100,0
Bazofil	506	0,39
Q2 (CD63 ^{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 ^{neg})	23	4,5

Rycina 4: Kontrola Stymulacji (STCON)

KONTROLA JAKOŚCI

Poniższe kryteria i środki kontroli jakości powinny być spełnione w celu uzyskania prawidłowego wyniku:

Populacje leukocytów: Zazwyczaj na wykresie FSC/SSC powinny pojawić się trzy różne populacje leukocytów: limfocyty, monocyty i granulocyty (odnieść się do ryciny 1). Ich występowanie można uznać za kryterium jakości próbki krwi (odstęp czasu między pobraniem próbki a wykonaniem testu, warunki przechowywania). Nie można ocenić wyników testu, jeśli uzyskano mniej niż 300 bazofilów.

Kontrole (pozytywne) stymulacji anty-FcεRI mAb i fMLP: Anty-FcεRI mAb naśladuje mostkowanie receptora spowodowane przez alergen *in vivo*. fMLP jest tripeptydem powodującym aktywację bazofilów w sposób nieimmunologiczny.

- Jeśli kontrola anty-FcεRI mAb wykazuje wartość $\geq 10\%$ aktywowanych bazofilów, próbki mogą być oceniane.
- Jeśli tylko kontrola fMLP wykazuje sygnał $\geq 10\%$, ale anty-FcεRI mAb nie, test został wykonany prawidłowo, ale nie można ocenić wyników testu. Pacjent jest uważany za niereagującego na IgE.
- Jeśli zarówno anty-FcεRI mAb jak i fMLP wykazują wartości $< 10\%$ aktywowanych bazofilów, prawdopodobny jest błąd techniczny. Wynik testu należy uznać za nieważny i test należy powtórzyć.

STANDARYZACJA

Flow CAST[®] wykrywa populację bazofilów wykazujących ekspresję markera powierzchniowego CD63 jako % całkowitej liczby bazofilów. Nie istnieją międzynarodowe ani krajowe materiały referencyjne ani referencyjne procedury pomiarowe dla tego analitu.

Odtwarzalność każdej partii jest gwarantowana przez miareczkowanie koniugatów przeciwciał monoklonalnych anty-CD63-FITC i anty-CCR3-PE względem kulek kalibracyjnych. W celu oszacowania zmienności między

partiami należy zapoznać się z wynikami odtwarzalności w sekcji „Charakterystyka wydajności”.

OGRANICZENIA

- Wyniki testu Flow CAST[®] należy interpretować w połączeniu z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych.
- Aby określić zaburzenia alergiczne związane z lekami, testy BAT należy wykonać w ciągu 6 miesięcy od wystąpienia reakcji alergicznej (ref. 8).
- Upewnić się, że upłynął co najmniej jeden do dwóch tygodni od reakcji alergicznej przed wykonaniem testu BAT (ref. 8).
- Negatywne wyniki uzyskane dla alergenów lekowych nie powinny być wykorzystane do wykluczenia alergii.
- Oczekuje się, że od 5 do 10% pacjentów nie będzie reagować na IgE. W przypadku tych pacjentów nie obserwuje się zwiększonej ekspresji CD63 i wyniku pozytywnego. Osoby niereagujące można zidentyfikować za pomocą kontroli stymulacji dostarczonych z testem Flow CAST[®] (ref. 9).
- Niewystarczająco wypełnione próbówki K-EDTA (wypełnione mniej niż do połowy) mogą prowadzić do wyników fałszywie ujemnych.
- U pacjentów leczonych omalizumabem (XOLAIR[®]) spodziewane są zakłócenia wyników testu Flow CAST[®] (ref. 10).
- Należy unikać podawania ogólnoustrojowych leków przeciwalergicznych, takich jak kortykosteroidy, kwas chromoglikanowy (DSCG) przez co najmniej 24 godziny przed pobraniem krwi.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Kategorie wyników dla testu Flow CAST[®] są następujące:

Wynik	Interpretacja
< cut-off	negatywny
\geq cut-off dla jednego lub obu rozcięć alergenu	pozytywny

Tabela 3

CUT-OFF I PRZEDZIAŁ REFERENCYJNY

Ustalono techniczny cut-off dla 5% aktywowanych bazofilów, gdzie wyniki $\geq 5\%$ CD63^{pos} wskazują na aktywację bazofilów.

Dla każdego alergenu lepszą specyficzność uzyskuje się poprzez zastosowanie specyficznych dla alergenu wartości cut-off, jak wskazano w broszurach dotyczących alergenów BÜHLMANN.

Przedziały referencyjne ustalono zgodnie z wytycznymi CLSI C28-A3. Sto dwadzieścia (120) próbek krwi z centrum krwiodawstwa stymulowano buforem stymulacji lub anty-FcεRI mAb i testowano zgodnie z protokołem standardowym i protokołem lizy bez płukania. Testy zostały przeprowadzone w ciągu 26 dni przez 3 operatorów przy użyciu dwóch partii odczynników Flow CAST[®].

Kontrola	Protokół testu	Przedział referencyjny (90% CI) [% CD63 ^{pos}]	
		2,5 percentyl	97,5 percentyl
Bufor Stymulacji	Standardowy	0,8 (0,5 - 1,2)	4,6 (4,1 - 6,4)
	Liza bez płukania	0,9 (0,6 - 1,0)	4,2 (3,9 - 5,3)
Anty-FcεRI mAb	Standardowy	18,0 (11,5 - 26,0)	97,7 (96,0 - 98,5)
	Liza bez płukania	13,2 (11,4 - 21,2)	96,4 (94,3 - 97,3)

Tabela 4

WYDAJNOŚĆ KLINICZNA

Wydajność kliniczna testu Flow CAST® została oceniona na podstawie podsumowującej analizy recenzowanej literatury naukowej. W analizie uwzględniono jednocześnie recenzowanych badań wybranych w systematycznym przeglądzie literatury obejmującym okres do listopada 2019, jedno badanie dotyczące jadów owadów nieznalesione w pierwszym przeglądzie oraz dwa badania dotyczące alergenów orzeszków ziemnych opublikowane po 2019 roku. W badaniach sprawdzano zdolność testu Flow CAST® do rozróżniania osób z zaburzeniami alergicznymi od osób bez alergii. Zaburzenia alergiczne u pacjenta z alergią zostały potwierdzone za pomocą a) wywiadu klinicznego, b) doustnej prowokacji pokarmowej (OFC) lub testu prowokacji, c) wywiadu klinicznego i testów laboratoryjnych (nakłucie skóry - SPT, slgE) lub d) wywiadu klinicznego i OFC/ testu prowokacji. Badania wykorzystujące slgE lub SPT jako jedyne odniesienie kliniczne zostały wykluczone. Wyniki podsumowano w tabeli 5.

Grupa alergenów	N badań	Czułość mediana (zakres)	Osoby z alergią (łącznie)	Specyficzność mediana (zakres)	Osoby kontrolne (łącznie)
Żywność	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Środki wziewne					
Jad owadów	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Leki	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Tabela 5

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna: ≤25% CV dla stymulanta

Powtarzalność (wewnątrzseryjna) i precyzja wewnątrzlaboratoryjna zostały ustalone w oparciu o wytyczne CLSI EP05-A3 i normę ISO 15197:2013. Cztery próbki krwi dawców stymulowano buforem stymulacji lub kontrolą stymulacji anty-FcεRI mAb. W przypadku standardowej procedury zastosowano projekt badania 2 operatorów x 4 dni x 1 seria x 4 powtórzenia. Dla procedury lizy bez płukania zastosowano projekt badania 2 operatorów x 1 dzień x 4 serie x 4 powtórzenia. Powtórzenia odpowiadają niezależnej reakcji stymulacji i pełnej procedurze testu. Wyniki dla kontroli stymulacji anty-FcεRI mAb podsumowano w Tabeli 6.

Protokół testu	Dawca	Średnia [%CD63]	n	Wewnątrz serii [%CV]	Pomiędzy dniami (A) Pomiędzy seriami (B) [%CV]	Łącznie [%CV]
standardowy (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%
Liza bez płukania (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%

Tabela 6

Odtwarzalność: ≤25% CV dla stymulanta

Odtwarzalność została ustalona w oparciu o wytyczne CLSI EP05-A3 i normę ISO 15197:2013. Cztery próbki krwi dawców stymulowano buforem stymulacji lub kontrolą stymulacji anty-FcεRI mAb. Próbki zostały zbadane w dwóch laboratoriach zgodnie ze standardowym protokołem. Zastosowano projekt badania 3 urządzenia/numery partii x 2 operatorów x 1 dzień x 5 powtórzeń. Powtórzenia odpowiadają niezależnej reakcji stymulacji i pełnej procedurze testu. Wyniki dla kontroli stymulacji anty-FcεRI mAb podsumowano w Tabeli 7.

Dawca	Średnia [%CD63]	n	Wewnątrz serii [%CV]	Pomiędzy operatorami [%CV]	Pomiędzy numerami partii/urządzeniami [%CV]	Łącznie [%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%

Tabela 7

SUBSTANCJE INTERFERUJĄCE

Wrażliwość testu Flow CAST® na środki farmaceutyczne, nieprawidłowe warunki krwi i dodatek K-EDTA do próbek, została oceniona zgodnie z wytycznymi CLSI EP07-A2. Błąd systematyczny w wynikach przekraczający 20% dla kontroli stymulacji anty-FcεRI mAb i 20% CD63^{pos} (bezwzględny) dla kontroli stymulacji fMLP uznano za interferencję. Nie wykryto interferencji z następującymi substancjami wymienionymi w Tabeli 8 w podanych stężeniach. U jednego dawcy wykryto interferencję z K-EDTA przy podwójnym stężeniu K-EDTA w próbce do poboru krwi żyłnej.

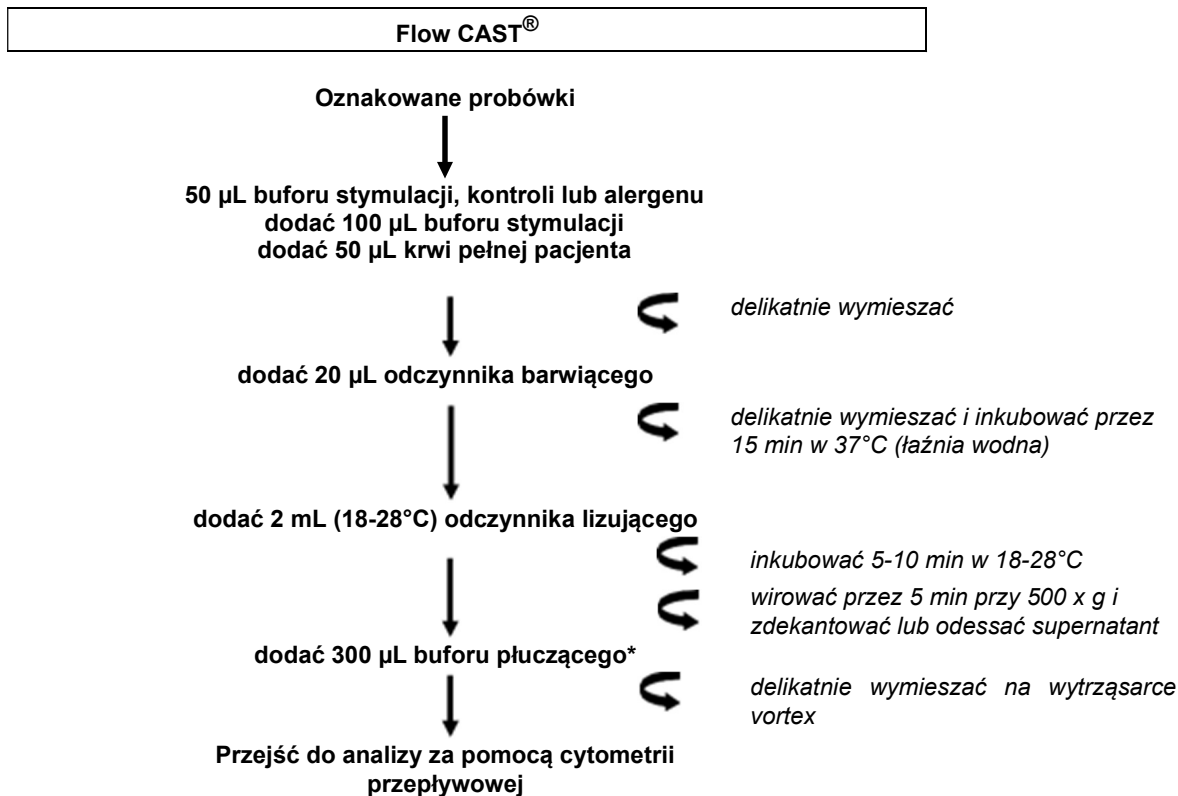
Składnik aktywny	Stężenie testowe [µg/mL]
Chlorowodorek feksofenadyny	1,6
Dichlorowodorek cetyryzyny	4,35
Dichlorowodorek hydroksyzyny	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednizon	1,2
N-Acetylo-L-tryptofan	30
Trójgliceryd (Intralipid)	20'000
Bilirubina związana	400
Bilirubina niezwiązana	400
Hemoliza	56'100

Tabela 8

REFERENCJE

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).

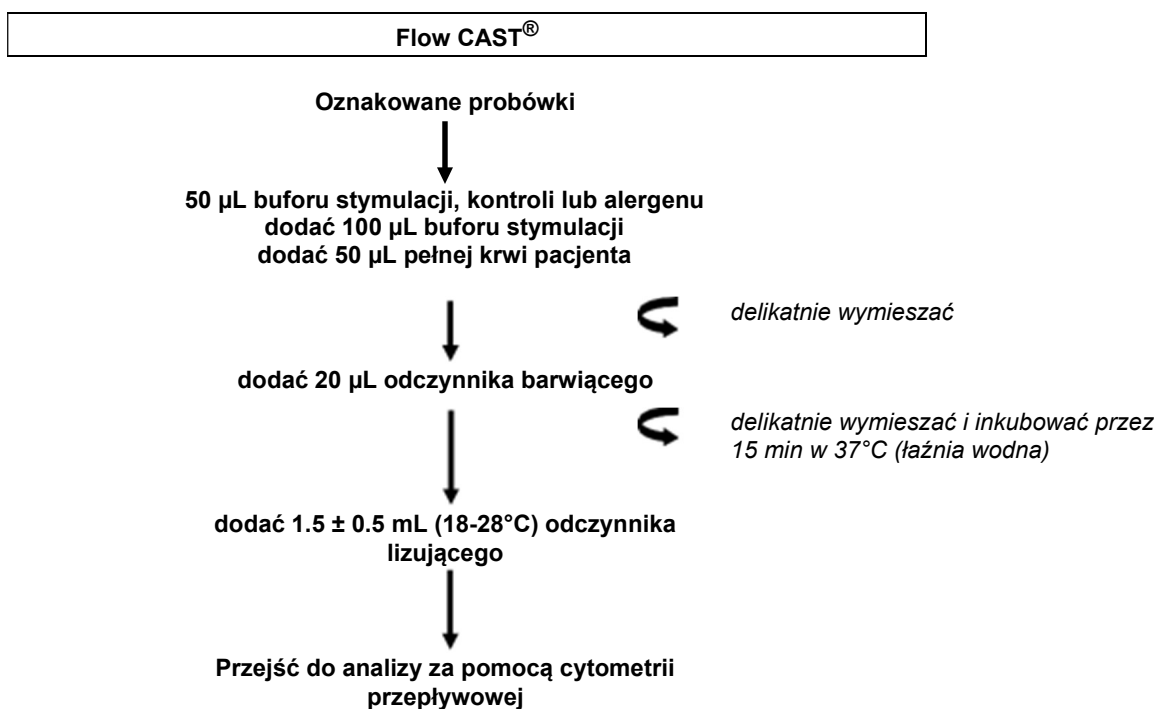
PROTOKÓŁ STANDARDOWY: LIZA I PŁUKANIE



CZAS DO AKWIZYCJI ~30 MIN / CZAS DO OTRZYMANIA WYNIKU: ~ 1 GODZINA

* Uwaga: W zależności od używanego urządzenia do cytometrii przepływowej, ilość buforu płuczającego powinna być dostosowana do objętości martwej i gęstości komórek zgodnej z urządzeniem.

PROTOKÓŁ ALTERNATYWNY: PROTOKÓŁ LIZY BEZ PŁUKANIA



CZAS DO AKWIZYCJI ~ 20 MIN/ CZAS DO OTRZYMANIA WYNIKU: ~ 1 GODZINA

LISTA ZMIAN

Data	Wersja	Zmiana
2023-06-21	A2	Zmiana sformułowań w rozdziale <i>Analiza danych i Wydajność kliniczna</i> Włączenie numeru jednostki notyfikowanej do znaku CE – procedura oceny zgodności wg IVDR 2017/746

RAPORTOWANIE WYPADKÓW W PAŃSTWACH CZŁONKOWSKICH UE

W przypadku wystąpienia jakiegokolwiek poważnego wypadku z udziałem tego urządzenia, należy bezzwłocznie zgłosić to producentowi i właściwemu organowi państwa członkowskiego.

USZKODZENIA PRZESYŁKI

Jeżeli produkt został uszkodzony należy poinformować o tym dystrybutora.

SYMBOLE

Firma BÜHLMANN stosuje symbole i oznaczenia wymienione i opisane w normie ISO 15223-1. Dodatkowo stosowane są następujące symbole i oznaczenia:

Symbol	Wyjaśnienie
BUF STIM	Bufor Stymulacji
CONTROL STIM	Kontrola Stymulacji
CONTROL FMLP	Kontrola Stymulacji fMLP
REAG STAIN	Odczynnik barwiący
REAG LYS	Odczynnik lizujący
BUF WASH	Bufor płuczący

