



Flow CAST®

Test aktivácie bazofilov (BAT)
Prietoková cytometria

Na diagnostické použitie *in vitro*

Testy FK-CCR100

Dátum vydania: 2023-06-21
Verzia A2



Výrobca

BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55

4124 Schönenbuch, Švajčiarsko

Tel: +41 61 487 1212

Fax: +41 61 487 1234

info@buhlmannlabs.ch

ZAMÝŠĽANÉ POUŽITIE

BÜHLMANN Flow CAST® je *in vitro* diagnostický test na kvalitatívne hodnotenie aktivácie bazofilov pri stimulácii špecifickými alergénmi. Test využíva prietokovú cytometriu na stanovenie populácie bazofilov exprimujúcich povrchový bunkový marker CD63 vo vzorkách plnej krvi pacienta K-EDTA. Flow CAST® je určený ako pomôcka pri diagnostike alergických porúch bezprostredného typu v spojení s ďalšími klinickými a laboratórnymi nálezmi.

Len na laboratórne použitie.

PRINCÍP SKÚŠKY

Flow CAST® je test aktivácie bazofilov založený na prietokovej cytometrii (ref. 1, 2). Plná krv pacientov sa stimuluje špecifickými alergénmi, ako aj stimulačným pufrom a stimulačnými kontrolami, aby sa vyhodnotila degranulácia bazofilov pacienta *ex vivo*. Vzorka sa farbí pomocou dvoch fluorescenčne značených monoklonálnych protilátok: jedna na selekciu bazofilov (anti-CCR3-PE) a druhá na určenie stavu aktivácie bazofilov (anti-CD63-FITC) (ref. 3 - 6) CD63 je transmembránový proteín prítomný na intracelulárnych vezikulách a na povrchu buniek sa prezentuje až po degranulácii bazofilov (ref. 7).

Erytrocyty zo vzorky pacienta sa odstránia lyzujúcou reakciou. V závislosti od protokolu sa bunky centrifugujú, resuspendujú v premývacom puffri a fixujú na neskoršiu analýzu prietokovou cytometriou alebo sa analyzujú priamo po lýze. Bazofily sú z populácie leukocytov vyčlenené ako CCR3^{pos}/SSC^{low}. Aktivačný stav gatovaných bazofilov sa určuje podľa ich expresie CD63 (aktivačný marker). Pacienti, ktorí nevyvolávajú alergické reakcie sprostredkované IgE, tzv. non-respondéri, sa identifikujú na základe výsledkov pozitívnych kontrol. Výsledok testu sa uvádza ako pomer CD63 pozitívnych bazofilov ku všetkým bazofilom (% aktivácie CD63).

DODANÉ ČINIDLÁ A PRÍPRAVA

Činidlá	Množstvo	Kód	Komentáre
Stimulačný pufor s obsahom vápnika, heparínu a IL-3	1 injekčná liekovka lyofilizovaná	B-CCR-STB	Rekonštituujte s 50 mL vody ¹⁾
Kontrola stimulácie anti-FcεRI mAb	1 injekčná liekovka lyofilizovaná	B-CCR- STCON	Rekonštituujte s 1,5 mL B-CCR-STB
Stimulácia Kontrola fMLP ²⁾	1 injekčná liekovka lyofilizovaná	B-CCR-FMLP	Rekonštituujte s 1,5 mL B-CCR-STB
Farbiace činidlo Zmes anti-CD63-FITC a anti-CCR3-PE mAb	1 injekčná liekovka 2,2 mL	B-CCR-SR	Pripravené na použitie
Lyzovacie činidlo ³⁾ 10x koncentrované	1 injekčná liekovka 25 mL	B-CCR-LYR	Zriedte 225 mL deionizovanej vody
Umývací pufor s 0,1% formaldehydom	1 injekčná liekovka 100 mL	B-CCR-WB	Pripravené na použitie

Tabuľka 1

¹⁾ Požadovanú kvalitu vody nájdete v kapitole Technické opatrenia

²⁾ N-formyl-metionyl-leucyl-fenylalanín

³⁾ Počas skladovania pri teplote 2-8 °C sa môžu tvoriť kryštály, ktoré by sa mali pred zriedením rozpustiť pri teplote 18-28 °C

SKLADOVANIE A TRVANLIVOSŤ ČINIDIEL

Neotvorené činidlá	
Uchovávajte pri teplote 2-8 °C. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie vytlačenom na štítkoch.	
Otvorené činidlá a rekonštituované činidlá	
Stimulačný pufor	Stabilita pri -20 °C počas 6 mesiacov. Ak sa očakáva opakované použitie, vytvorte alikvotnú časť.
Kontrola stimulácie	
Stimulácia Kontrola fMLP	
Lyzovacie činidlo	Stabilita pri 2-8 °C počas 6 mesiacov.
Farbiace činidlo	
Umývací pufor	

Tabuľka 2

POŽADOVANÉ, ALE NEPOSKYTOVANÉ MATERIÁLY

- K-EDTA venepunkčné skúmavky
- Odstredivka
- Jednorazové polypropylénové alebo polystyrénové skúmavky na prietokovú cytometriu bez obsahu pyrogénu
- Stojany na skúmavky na prietokovú cytometriu na stimuláciu
- Vírový mixér
- (Voliteľné) mikrotitračné platne na stimuláciu buniek a farbenie pre štandardný protokol
- (Voliteľné) hlboké jamky na stimuláciu buniek, farbenie, lýzu a získavanie údajov prietokovou cytometriou pre protokol lyse-no-wash
- Presné pipety s jednorazovými špičkami bez obsahu pyrogénu:
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - 1-5 mL nastaviteľná pipeta a
 - Voliteľné: nastaviteľný dávkovač 10-50 µL
- 50 mL valec na rekonštitúciu stimulačného puffru
- Sterilná, ultračistá a apyrogénna voda na rekonštitúciu stimulačného puffru (pozri kapitolu Technické opatrenia)
- Vodný kúpeľ (odporúča sa) alebo inkubátor nastavený na 37 °C
- Destilovaná alebo deionizovaná voda, ako aj vhodné laboratórne sklo na riedenie lyzujúceho činidla
- viečka alebo parafólia na zakrytie skúmaviek počas inkubácie
- Dávkovače na lyzujúce činidlo a premývací pufor s vrchnákom fľaše
- Prietokový cytometer vybavený laserovým zdrojom s vlnovou dĺžkou 488 nm (modrá), ako aj emisnými filtrami na detekciu PE a FITC
- Softvér pre prietokovú cytometrickú analýzu (pozri kapitolu Získavanie prietokových cytometrických údajov)

ALERGÉNY SA OBJEDNÁVAJÚ SAMOSTATNE

Alergény validované pre Flow CAST® ponúka spoločnosť BÜHLMANN samostatne. Objednávacie kódy alergénov, ako aj informácie o príprave alergénov nájdete v brožúrach o alergénoch BÜHLMANN na webovej stránke spoločnosti BÜHLMANN:

www.buhlmannlabs.ch

Dôležité: Flow CAST® bol testovaný len v kombinácii s CAST® Allergens, ktoré sú k dispozícii v laboratóriách BÜHLMANN AG. Za overenie použitia alergénov získaných z iných zdrojov zodpovedá výlučne laboratórium.

OPATRENIA

Bezpečnostné opatrenia

- Stimulačný pufo (B-CCR-STB) tohto testu obsahuje zložky ľudského pôvodu. Napriek tomu, že boli testované a zistené negatívne výsledky na povrchový antigén HBV, protilátky HCV a HIV1/2, s činidlami by sa malo zaobchádzať, ako keby mohli prenášať infekcie, a malo by sa s nimi zaobchádzať v súlade so správnou laboratórnou praxou (SLP) s použitím vhodných bezpečnostných opatrení.
- Zabráňte kontaktu činidiel s pokožkou, očami alebo sliznicami. Ak dôjde ku kontaktu s činidlami, okamžite ich umyte veľkým množstvom vody.
- S činidlami a chemikáliami sa musí zaobchádzať ako s nebezpečným odpadom v súlade s vnútroštátnymi smernicami alebo predpismi o biologickom nebezpečenstve.

Technické opatrenia

- Odporúčaná kvalita vody pre Flow CAST®: Použitie sterilnej, ultračistej a apyrogénnej vody na rekonštitúciu stimulačného pufru (B-CCR-STB) je nevyhnutné na dobrú a reprodukovateľnú stimuláciu bazofilov. Môžu sa použiť tieto zdroje vody: voda na bunkové kultúry, voda na infúziu alebo deionizovaná, dvakrát destilovaná voda, ktorá je ultrafiltrovaná v pravidelne dezinfikovanom 10 kDa ultrafiltrí.
- Lyzovacie činidlo (B-CCR-LYR) sa môže rekonštituovať s deionizovanou, dvakrát destilovanou vodou alebo vodou rovnakej kvality, aká sa používa na rekonštitúciu stimulačného pufru.
- Zabráňte kontaminácii alergénom počas stimulácie buniek: Aeroalergény v laboratóriu môžu kontaminovať otvorené vzorky krvi a bunkové suspenzie a spôsobiť zvýšené pozadie. Vzorky krvi a skúmavky na stimuláciu buniek musia byť starostlivo zakryté viečkami alebo parafóliou. V laboratóriu, kde sa vykonáva stimulácia buniek, sa vyhýbajte roztočom domáceho prachu, opelujúcim sa rastlinám, latexovým rukaviciam alebo vybaveniu potenciálne obsahujúcemu latex, ako aj otvoreným oknám. Odporúča sa vykonávať kroky prípravy buniek a stimulácie v digestore s laminárnym prúdením.
- V porovnaní s inkubátorom sa odporúča vodný kúpeľ z dôvodu efektívnejšieho prenosu tepla. Ak používate inkubátor, overte, či je teplota 37 °C. Nižšia alebo vyššia teplota môže ovplyvniť výsledky.
- Vo všeobecnosti sa očakáva nízka úroveň aktivácie bazofilov pri liekových alergénoch. Preto je veľmi dôležité, aby sa počas stimulácie dosiahli optimálne podmienky vrátane teploty. V prípade liekových alergénov sa odporúča používať jednotlivé skúmavky namiesto hlbokých jamiek.
- Komponenty sa nesmú používať po dátume expirácie vytlačenom na štítkoch.
- Nemiešajte rôzne dávky činidiel.
- Zabráňte kontaminácii činidiel.

Postup testovania

- Vytemperujte lyzujúce činidlo na izbovú teplotu (18-28 °C).

- Pred vykonaním testu si pozorne prečítajte pokyny. Ak sa reagenty nesprávne riedia, manipuluje sa s nimi alebo sa skladujú za iných podmienok, ako sú uvedené v tomto návode na použitie, bude to mať nepriaznivý vplyv na výkon testu.
- Vzorky, s ktorými sa nesprávne manipuluje, môžu spôsobiť nepresné výsledky.
- Prípravky overte okom, aby ste posúdili účinnosť lýzy. Erytrocyty môžu byť neúplne lyzované a na bodovom grafe difrakcie svetla sa môžu objaviť na rovnakom mieste ako leukocyty.
- Predĺžený čas lýzy môže viesť k strate buniek. Uistite sa, že máte k dispozícii aspoň 300 bazofilov na získanie údajov. Odporúčame, aby sa akvizícia vzoriek spracovaných protokolom lyse-no-wash vykonala do jednej hodiny.
- Prietoková cytometria môže poskytnúť falošné výsledky, ak: cytometer nie je správne nastavený, emisia fluorescencie nebola vhodne kompenzovaná, oblasti brány neboli starostlivo umiestnené.

ZBER A SKLADOVANIE VZORIEK

Odporúča sa, aby sa pacienti najmenej 24 hodín pred odberom krvi vyhýbali systémovo podávaným antialergickým liekom, ako sú kortikosteroidy, kyselina chromoglyková (DSCG).

Odoberte krv do **venepunkčných skúmaviek K-EDTA** naplnením skúmaviek po značku vyhradeného objemu. Skúmavky musia byť naplnené aspoň do polovice. Jeden (1) mL plnej krvi stačí približne na 18 skúmaviek.

Vzorky krvi neodstreďujte ani nemrazte.

Plná krv

Vzorky plnej krvi skladované pri teplote 2-8 °C by sa mali spracovať do 48 hodín od odberu.

Na stanovenie alergických porúch na lieky sa odporúča spracovať vzorky okamžite a najneskôr do 24 hodín po odbere vzorky.

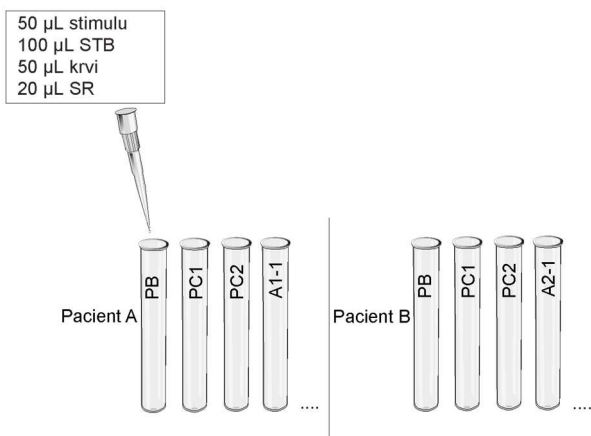
Vzorky plnej krvi sa môžu uchovávať aj pri izbovej teplote (teplota do 28 °C). Musia sa však spracovať do 24 hodín od odberu pomocou štandardného protokolu alebo v deň odberu pomocou protokolu lyse-no-wash.

Spracované vzorky

Bunky spracované podľa štandardného protokolu sú fixované. Fixované bunky sa môžu skladovať pri teplote 2-8 °C po dobu 5 dní chránené pred svetlom pre následné získavanie údajov prietokovou cytometriou.

POSTUP ANALÝZY

1. Niekoľkokrát prevrátením venepunkčnej skúmavky premiešajte vzorku krvi s antikoagulantom.
2. Pripravte si čerstvé štandardné polypropylénové alebo polystyrénové skúmavky na prietokovú cytometriu, ktoré neobsahujú pyrogén.
3. Pre každého pacienta označte skúmavky *napr.* takto:
PB = pozadie pacienta
PC1 = kontrola stimulácie s anti-FcεRI Ab
PC2 = kontrola stimulácie s fMLP
A1-1 pre alergén 1 s riedením 1
A1-2 pre alergén 1 s riedením 2 atď.



Stimulácia a farbenie

- Do každej skúmavky pridajte 50 µL príslušného stimulu:
PB skúmavka: 50 µL **stimulačného pufru** (pozadie pacienta)
Skúmavka PC1: 50 µL **stimulačnej kontroly** anti-FcεRI mAb
Skúmavka PC2: 50 µL **stimulačnej kontroly** fMLP
Skúmavka Ax-y: 50 µL **alergénu**
- Do každej skúmavky pridajte 100 µL stimulačného pufru (STB).
- Do každej skúmavky pridajte 50 µL plnej krvi pacienta. Uistite sa, že bočné a horné časti skúmavky sú bez krvi.
- Jemne premiešajte.
- Do každej skúmavky pridajte 20 µL farbiaceho činidla (SR).
- Jemne premiešajte, zakryte skúmavky a inkubujte 15 minút pri 37 °C vo **vodnom kúpeli**.

Poznámka: Ak sa namiesto vodného kúpeľa použije inkubátor, čas inkubácie sa predĺži na 25 minút z dôvodu menej účinného prenosu tepla.

Lyzovanie

Poznámka: Lyzovacie činidlo sa musí vyrovnáť na izbovú teplotu (18-28 °C).

Štandardný protokol: Lyzovanie a premývanie

- Do každej skúmavky pridajte 2 mL lyzovacieho činidla (18-28 °C) a jemne premiešajte.
- Inkubujte 5-10 minút pri teplote 18-28 °C.
- Odstreďujte skúmavky 5 minút pri 500 x g.
- Supernatant dekantujte pomocou blotovacieho papiera.
- Resuspendujte bunkový pelet s 300 µL premývacieho pufru (fixačný prostriedok je súčasťou premývacieho pufru).

Poznámka: Množstvo premývacieho pufru sa môže prispôbiť konkrétnemu použitému prístroju prietokového cytometra podľa mŕtveho objemu a hustoty buniek kompatibilných so zariadením.

- Jemne vír.

Bud' 16a.získajte vzorky na prietokovom cytometri.

Alebo 16b.ak sa vzorky nezískajú okamžite, nechajte ich inkubovať 30 minút pri RT a chráňte ich pred svetlom (fixácia). Vzorky skladujte uzavreté a chránené pred svetlom pri teplote 2-8 °C až do merania. Fixované bunky sa môžu skladovať pri 2-8 °C počas 5 dní na následné získanie

prietokovou cytometriou. Pred získaním vzorky v skúmavkách jemne premiešajte.

Poznámka: Uložené fixné vzorky možno kedykoľvek získať bez akejkoľvek predbežnej úpravy. Čas skladovania nájdete v časti "Zber a skladovanie vzoriek". Po dlhšom skladovaní možno pozorovať mierny pokles intenzity fluorescencie a nižšiu výťažnosť bazofilov $\geq 80\%$.

Alternatívny protokol: Protokol Lyse-no-wash

Nová generácia vysoko výkonných prietokových cytometrov dokáže analyzovať lyzované, neumyté vzorky. Tento postup sa musí prispôbiť použitému prístroju prietokového cytometra a môže si vyžadovať optimalizáciu. Nižšie uvedený protokol je založený na údajoch získaných pomocou prietokového cytometra Attune NxT (Thermo Fisher).

10. Vykonajte kroky postupu analýzy 1 až 9 (vyššie) a potom pokračujte krokom 10. Do každej skúmavky pridajte 1,5 ± 0,5 mL ekvilibrovaného (18-28 °C) lyzovacieho činidla, jemne premiešajte (objem sa musí optimalizovať v závislosti od možností rýchlosti získavania údajov použitého prietokového cytometra).

11. Získajte vzorky pomocou vysoko výkonného zariadenia vhodného pre prietokový cytometer pri vysokej rýchlosti získavania, aby sa čas analýzy minimalizoval.

Poznámka: Vzorky by sa mali analyzovať do 24 hodín od prijatia vzorky. Pozrite si časť "Zber a skladovanie vzoriek".

ZÍSKAVANIE PRIETOKOVÝCH CYTOMETRICKÝCH ÚDAJOV

Prietokovú cytometriu možno vykonať na akomkoľvek prietokovom cytometri pracujúcom s argónovou laserovou diódou 488 nm (modro-zelené excitačné svetlo).

Prietokový cytometer musí byť vybavený na detekciu priameho rozptylu (FSC), bočného rozptylu (SSC) a dvoch fluorochrómových kanálov FITC a PE.

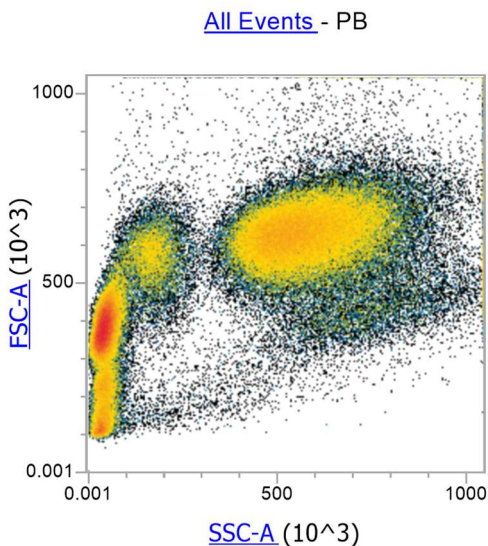
Skontrolujte, či je prietokový cytometer správne nastavený a či je nastavená kompenzácia farieb.

Na vhodné získanie a charakterizáciu pokojných a aktivovaných bazofilov vytvorte nasledujúci bodový graf :

- Vytvorte bodový graf 1 ako Forward Scatter vs Side Scatter, aby ste získali celú populáciu leukocytov, ako je znázornené na obrázku 1. Počas získavania vzoriek sa uistite, že populácia leukocytov je na bodovom grafe FSC/SSC rozdelená na tri samostatné populácie (lymfocyty, monocyty a granulocyty). Upravte zosilnenie (zisk) signálov FSC a SSC tak, aby ste získali rozdelenie podľa obrázku 1. Pokyny nájdete v príručkách k produktom prietokového cytometra.
- Vytvorte bodový graf 2, ako CCR3-PE vs Side Scatter, ako je znázornené na obrázku 2. Nastavte bránu (napr. bazofily) zahŕňajúcu celú populáciu bazofilov ako CCR3^{pos} a SSC^{low}, ako je znázornené s obdĺžnikovou bránou na obrázku 2. Eozinofily, ktoré sú tiež CCR3^{pos}, sa musia vylúčiť na základe vysokého SSC.
- Vytvorte bodový graf 3, ako CD63-FITC vs CCR3-PE, zobrazujúci iba bazofily s bráničkami, ako je znázornené na obrázku 3. Použite nestimulované, pokojné bazofily zo skúmavky s pozadím pacienta (PB) na nastavenie kvadrantovej brány vrátane CD63 negatívnych bazofilných buniek v pravom dolnom kvadrante (CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{low}), ako je znázornené na Obrázok 3. Výsledkom aktivácie bazofilov stimuláciou

pozitívnymi kontrolami a špecifickými alergénmi bude populácia CD63 pozitívnych bazofilov (CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}) identifikovaná v pravom hornom kvadrante, ako je znázornené na obrázku 4 s príkladom stimulácie pozitívnou kontrolou (STCON).

Odcítanie testu sa uvádza ako pomer CD63 pozitívnych bazofilov ku všetkým bazofilom (% aktivácie CD63), ako je identifikované v štvorcovej bráne bodového grafu 3 pre ktorúkoľvek zo stimulačných skúmaviek.



Obrázok 1: Tri diskretne populácie (lymfocyty, monocyty a granulocyty) na bodovom grafe FSC/SSC.

Získajte 500 alebo viac bazofilných buniek pre všetky stimulačné skúmavky (rozdelené podľa bodového grafu 2, obrázok 2 nižšie). Ak sa získa menej ako 300 bazofilných buniek (napr. v prípade bazopénie), výsledky testu nemožno vyhodnotiť.

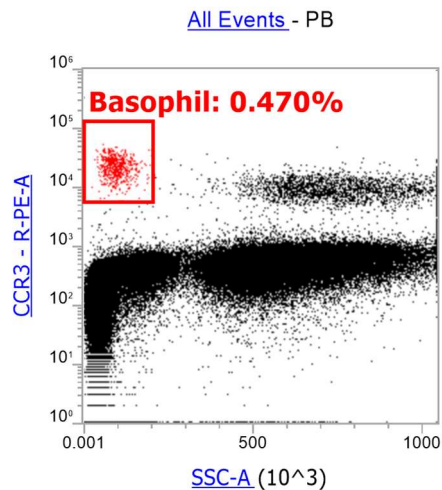
ANALÝZA ÚDAJOV

Získané údaje sa analyzujú pomocou príslušného softvéru na analýzu prietokovej cytometrie. Nastavte podobné bodové grafy a brány ako pri akvizícii.

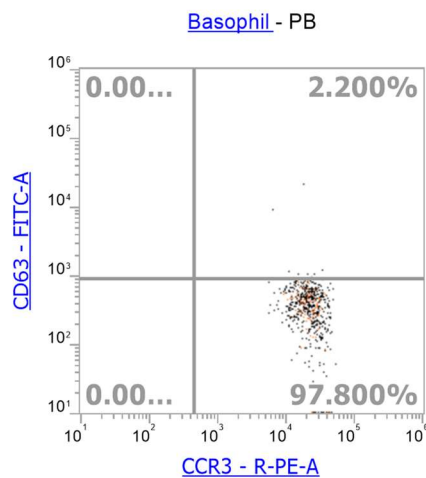
Brány, ktoré identifikujú bazofily v bodovom diagrame 2, môžu byť nezávisle prispôbené v ktorejkoľvek z rôznych stimulácií pre tú istú vzorku pacienta.

Na správne vyhodnotenie a štandardizáciu výsledkov sa pre každého jednotlivého pacienta definuje nastavenie pozadia pomocou stimulácie pozadia pacienta (PB). Kvadrantová brána nastavená na bodovom grafe 3 musí byť definovaná nastavená na PB. Na štandardizáciu analýzy sa brána nastaví na hodnotu medzi 2 a 2,5 % aktivovaných bazofilov vo vzorke PB každého pacienta (pozri obrázok 3).

Táto brána sa musí použiť na všetky následné stimulácie tých istých pacientov (PC1, PC2 a všetky merané alergény), aby sa vypočítalo percento CD63 pozitívnych buniek v každej stimulácii (pozri obrázok 4).

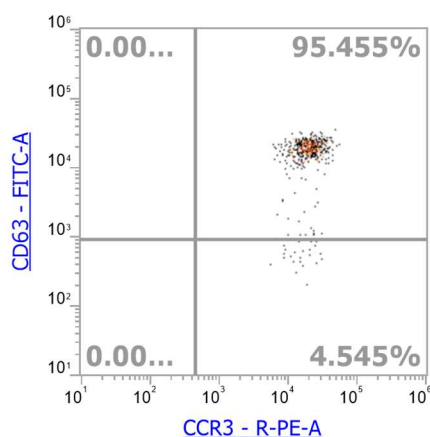


Obrázok 2: Výber bazofilných buniek CCR3^{pos} / SSC^{low}



Uzavretá oblasť	Počet (n=)	%
Celkom	125'864	100,0
Bazofily	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{neg})	578	97,8

Obrázok 3: Pozadie pacienta (PB) len s STB



Uzavretá oblasť	Počet (n=)	%
Celkom	130'926	100,0
Bazofily	506	0,39
Q2 (CD63 ^{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 ^{neg})	23	4,5

Obrázok 4: Ovládanie stimulácie (STCON)

KONTROLA KVALITY

Na získanie platného výsledku by mali byť splnené tieto kritériá a opatrenia na kontrolu kvality:

Populácie leukocytov: V grafe FSC/SSC by sa mali typicky objaviť tri odlišné populácie leukocytov: lymfocyty, monocyty a granulocyty (pozri obrázok 1). Ich výskyt možno považovať za kritérium kvality vzorky krvi (časový rámec medzi odberom vzorky a vykonaním testu, podmienky skladovania). Výsledky testu nemožno vyhodnotiť, ak sa získa menej ako 300 bazofilov.

Stimulačné (pozitívne) kontroly anti-FcεRI mAb a fMLP: Anti-FcεRI mAb napodobňuje premostenie receptora spôsobené alergénom *in vivo*. fMLP je tripeptid spôsobujúci aktiváciu bazofilov neimunologickým spôsobom.

- Ak kontrola Anti-FcεRI mAb vykazuje hodnotu $\geq 10\%$ aktivovaných bazofilov, vzorky sa môžu vyhodnotiť.
- Ak iba kontrola fMLP vykazuje signál $\geq 10\%$, ale Anti-FcεRI mAb nie, test bol vykonaný správne, ale výsledky testu nemožno vyhodnotiť. Pacient sa považuje za IgE non-respondera.
- Ak Anti-FcεRI mAb aj fMLP vykazujú hodnoty $< 10\%$ aktivovaných bazofilov, ide pravdepodobne o technickú chybu. Výsledok testu by sa mal považovať za neplatný a test by sa mal zopakovať.

ŠTANDARDIZÁCIA

Flow CAST® zisťuje populáciu bazofilov exprimujúcich povrchový marker CD63 ako % z celkového počtu bazofilov. Pre tento analyt neexistujú žiadne medzinárodne alebo národne uznávané referenčné materiály alebo referenčné postupy merania.

Reprodukovateľnosť jednotlivých šarží je zaručená titráciou konjugátov monoklonálnych protilátok anti-CD63-FITC a anti-CCR3-PE proti kalibračným guľôčkam. Odhad odchýlky medzi jednotlivými šaržami nájdete vo výsledkoch reprodukovateľnosti v časti "Výkonnostné charakteristiky".

OBMEDZENIA

- Výsledky testu Flow CAST® by sa mali interpretovať v spojení s ostatnými klinickými a laboratórnymi nálezmi.
- Na určenie alergických porúch súvisiacich s liekmi by sa testovanie BAT malo vykonať do 6 mesiacov od alergickej reakcie (ref. 8).
- Pred vykonaním testovania BAT sa uistite, že po alergickej reakcii uplynuli aspoň jeden až dva týždne (ref. 8).
- Negatívne výsledky získané na alergény liekov by sa nemali používať na vylúčenie alergie.
- Očakáva sa, že 5 až 10 % pacientov nebude reagovať na IgE. U týchto pacientov nebude pozorovaná upregulácia expresie CD63 a pozitívny výsledok. Non-responderov možno identifikovať pomocou stimulačných kontrol, ktoré sa poskytujú s testom Flow CAST® (ref. 9).
- Nedostatočne naplnené skúmavky K-EDTA (naplnené menej ako do polovice) môžu viesť k falošne negatívnym výsledkom.
- U pacientov liečených omalizumabom (XOLAIR®) sa očakáva interferencia s výsledkami testu Flow CAST® (ref. 10).
- Systémovo podávaným antialergickým liekom, ako sú kortikosteroidy, kyselina chromoglyková (DSCG), sa treba vyhnúť najmenej 24 hodín pred odberom krvi.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Kategórie výsledkov Flow CAST® sú tieto:

Výsledok	Výklad
< cut-off	negatívne
\geq hraničná hodnota pre jedno alebo obe zriedenia alergénu.	pozitívne

Tabuľka 3

CUT-OFF A REFERENČNÝ INTERVAL

Bola stanovená technická hranica 5 % aktivovaných bazofilov, pričom výsledky $\geq 5\%$ CD63^{pos} naznačujú aktiváciu bazofilov.

Pre každý alergén sa lepšia špecifickosť dosiahne použitím hraničných hodnôt špecifických pre alergén, ako je uvedené v brožúrach o alergénoch BÜHLMANN.

Referenčné intervaly boli stanovené podľa CLSI C28-A3. Stodvadsať (120) vzoriek krvi z centra pre darcovstvo krvi bolo stimulovaných stimulačným pufrom alebo Anti-FcεRI mAb a testovaných podľa štandardných protokolov a protokolov lyse-no-wash. Testovanie vykonali v priebehu 26 dní traja operátori s dvoma šaržami reagencií Flow CAST®.

Kontrola	Test Protokol	Referenčný interval (90% CI) [% CD63 ^{pos}]	
		2,5 percentilu	97,5 percentilu
Stimulačný pufér	štandard	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	štandard	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)

Tabuľka 4

KLINICKÝ VÝKON

Klinická výkonnosť systému Flow CAST® sa hodnotila v systematickom prehľade vedeckej literatúry. Do analýzy bolo zahrnutých jedenásť recenzovaných štúdií identifikovaných v systematickej rešerši literatúry pokrývajúcej obdobie do novembra 2019, jedna štúdia o jedoch hmyzu, ktorá nebola identifikovaná v pôvodnej rešerši, a dve štúdie o alergénoch arašidov publikované po roku 2019. V štúdiách sa skúmala schopnosť systému Flow CAST® rozlíšiť osoby s alergickými poruchami od nealergických osôb. Alergické poruchy u alergického subjektu boli potvrdené buď a) klinickou anamnézou pacienta, b) orálnou potravinovou výzvou (OFC) alebo provokačným testom, c) klinickou anamnézou a laboratórnym testom (kožný prick - SPT, sIgE) alebo d) klinickou anamnézou a OFC/ provokačným testom. Štúdie, ktoré používali sIgE alebo SPT ako jedinou klinickú referenciu, boli vylúčené. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 5.

Skupina Allergen Group	N štúdie	Citlivosť medián (rozsah)	Alergické subjekty (spolu)	Špecifickosť medián (rozsah)	Kontrolné subjekty (spolu)
Potraviny	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Inhalanty					
Jedy hmyzu	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Drogy	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Tabuľka 5

VÝKONNOSTNÉ CHARAKTERISTIKY

Presnosť v rámci laboratória: ≤25% CV pre stimul

Opakovateľnosť (v rámci série) a presnosť v rámci laboratória boli stanovené na základe usmernenia CLSI EP05-A3 a normy ISO 15197:2013. Štyri vzorky krvi darcov boli stimulované stimulačným pufrom alebo stimulačnou kontrolou anti-FcεRI mAb. Pre štandardný postup sa použil dizajn štúdie 2 operátori x 4 dni x 1 beh x 4 replikáty. Pre postup lyse-no-wash sa použil plán štúdie 2 operátori x 1 deň x 4 série x 4 opakovania. Opakovanie zodpovedá nezávislej stimulačnej reakcii a úplnému postupu analýzy. Výsledky pre stimulačnú kontrolu anti-FcεRI mAb sú zhrnuté v tabuľke 6.

Protokol o teste	Darca	Priemer [%CD63]	n	V rámci behu [%CV]	Medzidenné (A) Medzipristátie (B) [%CV]	Spolu [%CV]
štandard (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%

Tabuľka 6

Reprodukovateľnosť: ≤25% CV pre stimul

Reprodukovateľnosť bola stanovená na základe usmernenia CLSI EP05-A3 a normy ISO 15197:2013. Štyri vzorky krvi darcov boli stimulované stimulačným pufrom alebo stimulačnou kontrolou anti-FcεRI mAb. Vzorky sa testovali na dvoch laboratórných pracoviskách podľa štandardného protokolu. Použil sa plán štúdie 3 prístroje/šarže x 2 operátori x 1 deň x 5 opakovaní. Replikát zodpovedá nezávislej stimulačnej reakcii a úplnému postupu analýzy. Výsledky pre stimulačnú kontrolu anti-FcεRI mAb sú zhrnuté v tabuľke 7.

Darca	Priemer [%CD63]	n	V rámci behu [%CV]	Medzi operátormi [%CV]	Medzi parcelami/ prístrojmi [%CV]	Spolu [%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%

Tabuľka 7

INTERFERUJÚCE LÁTKY

Citlivosť testu Flow CAST® na liečivá, abnormálne krvné podmienky a prídavok vzorky K-EDTA sa posudzovala podľa usmernenia CLSI EP07-A2. Za interferenciu sa považovalo skreslenie výsledkov presahujúce 20 % pre stimulačnú kontrolu anti-FcεRI mAb a 20 % CD63^{pos} (absolútne) pre stimulačnú kontrolu fMLP. Pri uvedených koncentráciách sa nezistili žiadne interferencie s látkami uvedenými v tabuľke 8 v uvedených koncentráciách. Interferencia bola zistená s K-EDTA pri dvojnásobnej koncentrácii K-EDTA vo venepunkčnej skúmvavke u jedného darcu.

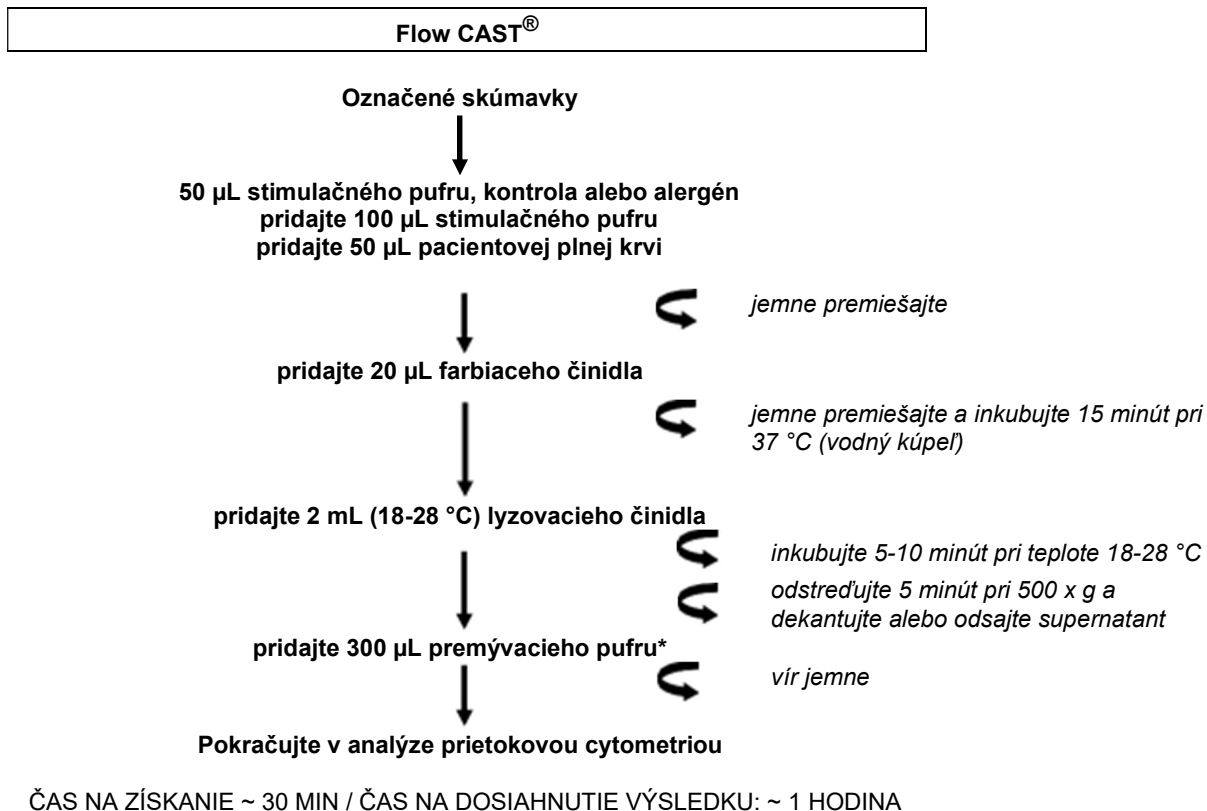
Aktívna zložka	Testovaná koncentrácia [µg/mL]
Fexofenadín hydrochlorid	1,6
Cetirizín dihydrochlorid	4,35
Hydroxyzín dihydrochlorid	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednizón	1,2
N-acetyl-L-tryptofán	30
Triglycerid (Intralipid)	20'000
Konjugovaný bilirubín	400
Nekonjugovaný bilirubín	400
Hemolýza	56'100

Tabuľka 8

ODKAZY

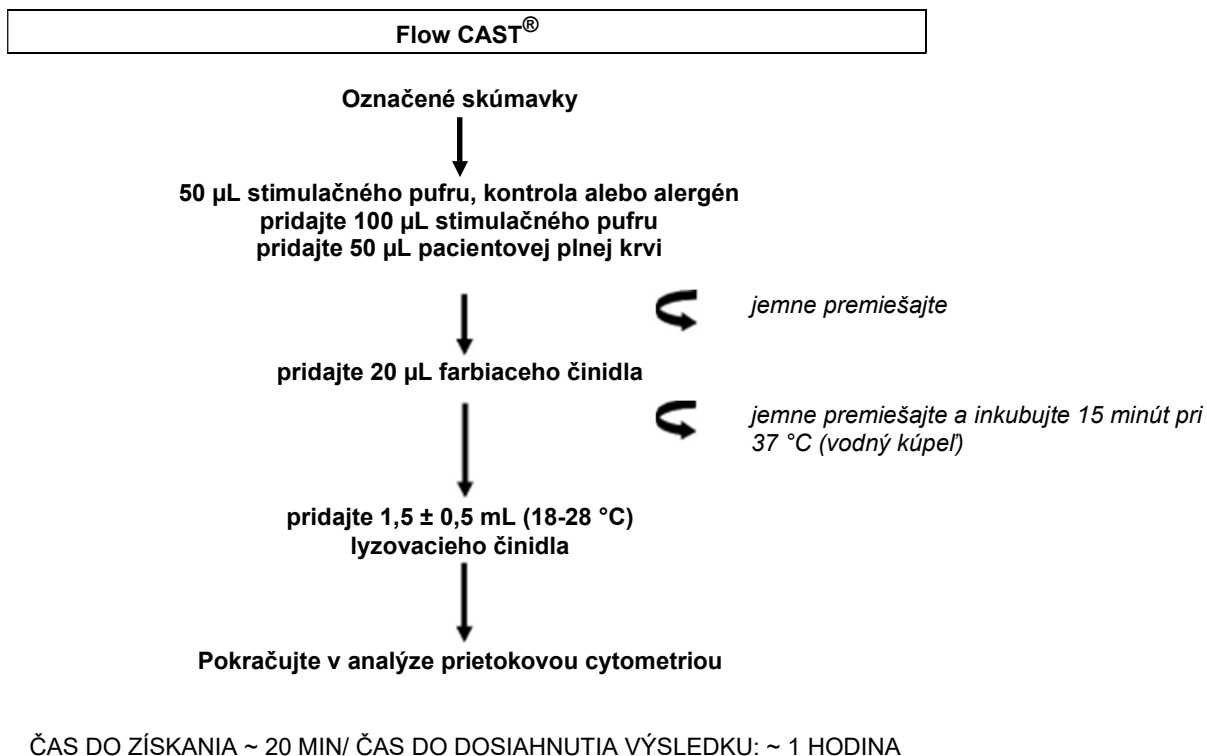
1. Sainte-Laudy, J, et al. [Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis]. *Allerg Immunol (Paris)* 26, 211-4. (1994).
2. Sabbah, A and Sainte-Laudy, J. Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation. *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).

ŠTANDARDNÝ PROTOKOL: LYZOVANIE A PREMÝVANIE



* Poznámka: V závislosti od použitého prístroja prietokového cytometra by sa malo množstvo premývacieho pufru prispôbiť mŕtvemu objemu a hustote buniek kompatibilnej s prístrojom.

ALTERNATÍVNY PROTOKOL: PROTOKOL LYSE-NO-WASH



ZOZNAM ZMIEN

Dátum	Verzia	Zmena
2023-06-21	A2	Preformulovanie kapitoly <i>Analýza údajov a Klinický výkon</i> Pridanie čísla notifikovaného orgánu k značke CE - postup posudzovania zhody podľa IVDR 2017/746

HLÁSENIE INCIDENTOV V ČLENSKÝCH ŠTÁTOCH EÚ

Ak sa v súvislosti s touto pomôckou vyskytne akýkoľvek závažný incident, bezodkladne to nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu vášho členského štátu.

POŠKODENIE PRI PREPRAVE

Ak ste tento výrobok dostali poškodený, oznámte to svojmu distribútorovi.

SYMBOLY

Spoločnosť BÜHLMANN používa symboly a značky uvedené a opísané v norme ISO 15223-1. Okrem toho sa používajú nasledujúce symboly a značky:

Symbol	Vysvetlenie
BUF STIM	Stimulačný pufor
CONTROL STIM	Kontrola stimulácie
KONTROLA FMLP	Stimulácia Kontrola fMLP
REAG STAIN	Farbiace činidlo
REAG LYS	Lyzovacie činidlo
BUF WASH	Umývací pufor

