



Flow CAST®

Тест за активиране на базофили (BAT)
Поточна цитометрия

За ин витро диагностична употреба

FK-CCR 100 теста

Дата на излизане: 2023-06-21
Версия A2

 **Производител**

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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

BÜHLMANN Flow CAST® е ин-витро диагностичен тест за качествена оценка на базофилната активация при стимулация със специфични алергени. Тестът използва поточна цитометрия за определяне на базофилната популация, експресираща CD63 клетъчен повърхностен маркер в проби от K-EDTA цяла кръв на пациенти. Flow CAST® е предназначен като помощно средство за диагностициране на незабавен тип алергични разстройства във връзка с други клинични и лабораторни находки.

Само за лабораторна употреба.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Flow CAST® е базиран на поточна цитометрия тест за активиране на базофили (реф. 1, 2). Цялата кръв от пациенти се стимулира със специфични алергени, както и буфер за стимулиране и контроли за стимулиране, за да се оцени базофилната дегранулация на пациента *ex vivo*. Пробата се оцветява с помощта на две флуоресцентно белязани моноклонални антитела: едно за селекция на базофил (анти-CCR3-PE) и едно за определяне на статуса на активиране на базофил (анти-CD63-FITC) (реф. 3-6) CD63 е трансмембранен протеин, присъстващ на вътреклетъчни везикули и се представяват само на клетъчната повърхност след базофилна дегранулация (реф. 7).

Еритроцитите от пробата на пациента се отстраняват чрез лизираща реакция. В зависимост от протокола, клетките се центрофугират, ресуспендират се в промивен буфер и се фиксират за по-късен анализ чрез поточна цитометрия или се анализират директно след лизис. Базофилите се отделят от левкоцитната популация като CCR3^{pos}/SSC^{low}. Статусът на активиране на затворените базофили се определя от тяхната експресия на CD63 (маркер за активиране). Пациентите, които не предизвикват IgE-медиранни алергични реакции, така наречените неотговорили, се идентифицират въз основа на резултатите от положителните контроли. Отчитането на анализа е посочено като съотношение на CD63 положителни базофили към всички базофили (%CD63 активиране).

ДОСТАВЕНИ РЕАКТИВИ И ПОДГОТОВКА

Реактиви	Количество	Код	Коментари
Стимулиращ буфер съдържащи калций, хепарин и IL-3	1 флакон лиофилизиран	B-CCR-STB	Разтворете с 50 mL вода ¹⁾
Контрол на стимулацията анти-FcεR1 mAb	1 флакон лиофилизиран	B-CCR-STCON	Разтворете с 1,5 mL от B-CCR-STB
Контрол на стимулацията fMLP ²⁾	1 флакон лиофилизиран	B-CCR-FMLP	Разтворете с 1,5 mL от B-CCR-STB
Оцветяващ реагент Микс от анти-CD63-FITC и анти-CCR3-PE mAb	1 флакон 2,2 mL	B-CCR-SR	Готов за употреба
Лизиращ реагент ³⁾ 10x концентриран	1 флакон 25 mL	B-CCR-LYR	Разредете с 225 mL дейонизирана вода
Измиващ буфер с 0,1% формалдеhid	1 флакон 100 mL	B-CCR-WB	Готов за употреба

Таблица 1

¹⁾ За необходимото качество на водата вижте глава Технически предпазни мерки

²⁾ N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

³⁾ Кристалите могат да се образуват по време на съхранение при 2-8°C и трябва да се разтворят при 18-28°C преди разреждане

СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАКТИВИТЕ

Неотворени реактиви	
Съхранявайте при 2-8 °C. Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност, отпечатан върху етикетите.	
Отворени реактиви и възстановени реактиви	
Стимулиращ буфер	Стабилен при -20°C в продължение на 6 месеца. Отлейте, ако се очаква многократна употреба.
Контрол на стимулацията	
Контрол на стимулацията fMLP	
Лизиращ реагент	Стабилен при 2-8°C в продължение на 6 месеца.
Оцветяващ реагент	
Измиващ буфер	

Таблица 2

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, НО НЕ СА ПРЕДОСТАВЕНИ

- K-EDTA тръбички за венепункция
- Центрофуга
- Епруветки за проточна цитометрия от полипропилен или полистирен за еднократна употреба, без пирогени
- Стойки за епруветки за проточна цитометрия за стимулация
- Вихров миксер
- (По избор) микротитърни плаки за тъканна култура за клетъчна стимулация и оцветяване за стандартния протокол
- (По избор) плаки с дълбоки ямки за клетъчна стимулация, оцветяване, лизис и придобиване на поточна цитометрия за протокола за лизиране без измиване
- Прецизни пипети с еднократни, апиrogenни накрайници:
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - 1-5 mL регулируема пипета и
 - По избор: 10-50 µL регулируем дозатор
- 50 mL цилиндър за разтваряне на буфера за стимулация
- Стерилна, свръхчиста и апиrogenна вода за разтваряне на буфера за стимулация (вижте глава Технически предпазни мерки)
- Водна баня (препоръчително) или инкубатор, настроен на 37°C
- Дестилирана или дейонизирана вода, както и подходяща лабораторна стъклария за разреждане на лизиращия реагент
- Капаци или парафилм за покриване на епруветките по време на етапите на инкубация
- Дозатори за бутилка за лизиращ реагент и промивен буфер
- Поточен цитометър, оборудван с 488 nm (син) лазерен източник, както и емисионни филтри за PE и FITC откриване
- Софтуер за флоуцитометричен анализ (вижте глава набиране на данни от поточна цитометрия)

АЛЕРГЕНТЕ СЕ ПОРЪЧВАТ ОТДЕЛНО

Алергените, валидирани за Flow CAST®, се предлагат отделно от BÜHLMANN. За кодове за поръчка на алергени, както и информация относно подготовката на алергени, вижте брошурите за BÜHLMANN Алергени на уебсайта на BÜHLMANN:

www.buhmannlabs.ch

Важно: Flow CAST® е тестван само в комбинация с CAST® Allergens, предлагани от BÜHLMANN Laboratories AG. Единствената отговорност на лабораторията е да потвърди употребата на алергени, получени от други източници.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Мерки за безопасност

- Буферът за стимулиране (B-CCR-STB) на този тест съдържа компоненти от човешки произход. Въпреки че са тествани и е установено, че са отрицателни за HBV повърхностен антиген, HCV и HIV1/2 антитела, с реагентите трябва да се работи така, сякаш са способни да предават инфекции и трябва да се работи в съответствие с добрите лабораторни практики (GLP), като се използват подходящи предпазни мерки.
- Избягвайте контакт на реагентите с кожата, очите или лигавиците. Ако се случи контакт, незабавно измийте обилно с вода.
- Реагентите и химикалите трябва да се третират като опасен отпадък в съответствие с националните насоки или разпоредби за безопасност при биологични опасности.

Технически предпазни мерки

- Препоръчително качество на водата за Flow CAST®: Използването на стерилна, ултрачиста и апиrogenна вода за разтваряне на буфера за стимулиране (B-CCR-STB) е от съществено значение за добрата и възпроизводима базофилна стимулация. Могат да се използват следните източници на вода: вода за клетъчни култури, вода за инфузии или дейонизирана, двойно дестилирана вода, която е ултра-филтрирана в периодично дезинфекциран 10 kDa ултра филтър.
- Лизирацията реагент (B-CCR-LYR) може да бъде възстановен с дейонизирана, двойно дестилирана вода или вода със същото качество, което се използва за разтваряне на буфера за стимулиране.
- Избягвайте замърсяване с алергени по време на клетъчна стимулация: Аероалергените в лабораторията могат да замърсят отворени кръвни проби и клетъчни суспензии, причинявайки повишен фон. Кръвните проби и епруветките за клетъчна стимулация трябва да бъдат внимателно покрити с капаци или парафилм. Избягвайте акари от домашен прах, опрашващи растения, латексови ръкавици или оборудване, потенциално съдържащо латекс, както и отворени прозорци в лабораторията, където се извършва клетъчната стимулация. Препоръчва се подготовката на клетките и етапите на стимулация да се извършват в абсорбатор с ламинарен поток.
- Препоръчва се водна баня в сравнение с инкубатор, поради по-ефективен пренос на топлина. Ако използвате инкубатор, проверете дали температурата е 37°C. По-ниските или по-високите температури могат да повлияят на резултатите.
- Като цяло се очаква ниско ниво на активиране на базофилите за лекарствени алергени. Следователно е изключително важно да се постигнат оптимални условия по време на стимулация, включително температура. За лекарствени алергени се препоръчва използването на единични епруветки вместо плаки с дълбоки ямки.
- Компонентите не трябва да се използват след изтичане на срока на годност, отпечатан върху етикетите.
- Не смесвайте различни партиди реактиви.
- Избягвайте замърсяване на реагентите.

Тестова процедура

- Уравновесете лизирация реагент до стайна температура (18-28 °C).
- Прочетете внимателно инструкциите преди извършване на

теста. Ефективността на теста ще бъде неблагоприятно засегната, ако реагентите са неправилно разреждени, боравени или съхранявани при условия, различни от описаните в тази инструкция за употреба.

- Проби, които не са обработени правилно, могат да доведат до неточни резултати.
- Проверете препаратите на око, за да оцените ефикасността на лизиса. Еритроцитите може да са непълно лизирани и да се появят на точкова диаграма на дифракция на светлина на същото място като левкоцитите.
- Продължителното време на лизис може да доведе до загуба на клетки. Уверете се, че имате поне 30 базофили за събиране на данни. Препоръчваме вземането на проби, обработени с протокола lyse-no-wash, да се извърши в рамките на един час.
- Поточната цитометрия може да доведе до неверни резултати, ако: цитометърът е неправилно подравнен, флуоресцентната емисия не е подходящо компенсирани, зоните на стробирание не са внимателно позиционирани.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ОБРАЗЦИ

Препоръчва се пациентите да избягват системно прилагани антиалергични лекарства като кортикостероиди, хромоглицинова киселина (DSCG) поне 24 часа преди вземането на кръвна проба.

Съберете кръв в **K-EDTA епруветки за венепункция**, като напълните епруветките до обозначението за обем. Тубите трябва да се напълнят поне наполовина. Един (1) mL цяла кръв е достатъчен за приблизително 18 епруветки.

Не центрофугирайте и не замразявайте кръвни проби.

Пълна кръв

Пробите от цяла кръв, съхранявани при 2-8 °C, трябва да бъдат обработени в рамките на 48 часа след вземането.

За определяне на алергични разстройства към лекарства се препоръчва пробите да се обработват незабавно и не по-късно от 24 часа след вземането на пробите.

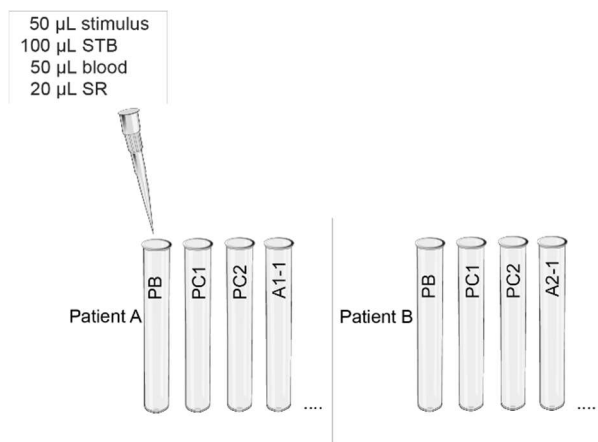
Пробите от цяла кръв могат също да се съхраняват при стайна температура (температури до 28 °C). Те обаче трябва да бъдат обработени в рамките на 24 часа след събирането, като се използва стандартният протокол или в деня на събирането, като се използва протоколът за лизирание без измиване.

Обработени проби

Клетките, обработени по стандартния протокол, са фиксирани. Фиксираните клетки могат да се съхраняват при 2-8 °C в продължение на 5 дни защитени от светлина за последващо получаване чрез поточна цитометрия.

ПРОЦЕДУРА ЗА АНАЛИЗ

- Смесете антикоагулираната кръвна проба, като обърнете епруветката за венепункция няколко пъти.
- Подгответе свежи и апиrogenни стандартни полипропиленови или полистиренови епруветки за поточна цитометрия.
- За всеки пациент маркирайте епруветките, напр. следното:
PB = фон на пациента
PC1 = контрол на стимулацията с анти-FcεRI Ab
PC2 = контрол на стимулацията с fMLP
A1-1 за алерген 1 с разреждане 1
A1-2 за алерген 1 с разреждане 2 и др.



Стимулиране и оцветяване

- Добавете 50 µL от съответния стимул към всяка епруветка:
PB епруветка: 50 µL **стимулиращ буфер** (на фона на пациента)
PC1 епруветка: 50 µL анти-FcεRI mAb за **контрол на стимулацията**
PC2 епруветка: 50 µL fMLP за **контрол на стимулацията**
Ах-у тръба: 50 µL **алерген**
- Добавете 100 µL буфер за стимулация (STB) към всяка епруветка.
- Добавете 50 µL цяла кръв на пациента към всяка епруветка. Уверете се, че отстрани и отгоре на епруветката няма кръв.
- Разбъркайте внимателно.
- Добавете 20 µL оцветяващ реагент (SR) към всяка епруветка.
- Разбъркайте внимателно, покрийте епруветките и инкубирайте за 15 минути при 37°C във водна баня.

Забележка: Ако се използва инкубатор, вместо водна баня, времето за инкубация се удължава до 25 минути поради по-малко ефективен пренос на топлина.

Лизиране

Забележка: лизиращият реагент трябва да бъде уравнишен до стайна температура (18-28 °C).

Стандартен протокол: лизирайте и промийте

- Добавете 2 mL уравнишен (18-28°C) лизиращ реагент към всяка епруветка, разбъркайте внимателно.
- Инкубирайте за 5-10 минути при 18-28°C.
- Центрофугирайте епруветките за 5 минути при 500 x g.
- Декантирайте супернатанта с помощта на попивателна хартия.
- Ресуспендирайте клетъчната утайка с 300 µL промивен буфер (в промивния буфер е включен фиксатор).

Забележка: Количеството на промивния буфер може да бъде адаптирано към използваната конкретна апаратура за поточен цитометър, според мъртвия обем и плътността на клетките, съвместими с устройството.

- Въртете внимателно.

Или 16a. вземете пробите на поточен цитометър.

или 16b. ако не са получени веднага, оставете пробите да се инкубират за 30 минути при стайна температура и защитени от светлина (фиксация). Съхранявайте пробите запечатани и защитени от светлина при 2-8°C до измерването. Фиксираните клетки могат да се съхраняват при 2-8 °C в продължение на 5 дни за последващо получаване чрез поточна цитометрия. Разбъркайте внимателно епруветките с проби преди събиране.

Забележка: Съхранените фиксирани проби могат да бъдат получени без предварителна обработка по всяко време. Моля, вижте раздела „Събиране и съхранение на образци“ за времената на съхранение. След по-продължително съхранение може да се наблюдава леко намаляване на интензитета на флуоресценция и по-ниско възстановяване на базофилите ≥80%.

Алтернативен протокол: протокол за лизиране без измиване

Ново поколение, високоефективни поточни цитометри могат да анализират лизирани, неизмити проби. Тази процедура трябва да бъде адаптирана към използваната апаратура на поточния цитометър и може да изисква оптимизиране. Протоколът по-долу се основава на данни, получени с поточен цитометър Attune NxT (Thermo Fisher).

- Изпълнете стъпки от 1 до 9 на процедурата за анализ (по-горе) и след това продължете от стъпка 10 тук. Добавете 1,5 ± 0,5 mL уравнишен (18-28°C) лизиращ реагент към всяка епруветка, разбъркайте внимателно (обемът трябва да бъде оптимизиран в зависимост от възможностите за скорост на придобиване на използвания поточен цитометър).
- Вземете пробите с помощта на високопроизводително подходящо устройство за поточен цитометър при висока скорост на получаване, за да запазите времето за анализ минимално.

Забележка: Пробите трябва да бъдат анализирани в рамките на 24 часа след получаване на пробата. Моля, вижте раздел „Събиране и съхранение на образци“.

НАБИРАНЕ НА ДАННИ ОТ ПОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЯ

Придобиването на поточна цитометрия може да се извърши на всеки поточен цитометър, работещ с 488 nm аргонов лазерен диод (синьо-зелена възбуждаща светлина).

Поточният цитометър трябва да бъде оборудван за откриване на разсейване напред (FSC), странично разсейване (SSC) и двата флуорохрома FITC и PE канала.

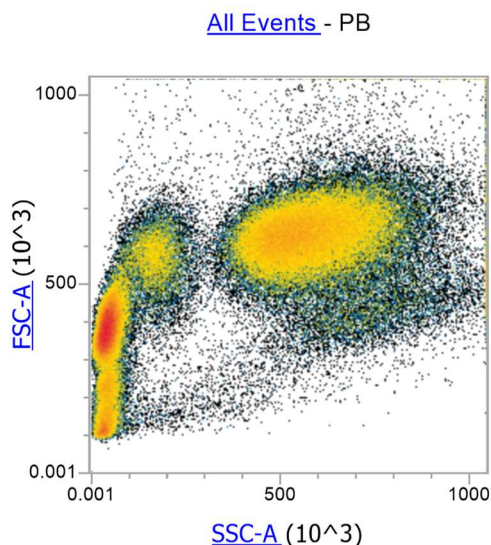
Уверете се, че проточният цитометър е правилно подравнен и цветовата компенсация е зададена.

За подходящо придобиване и характеризиране на базофили в покой и активирани, създайте следната точкова диаграма:

- Създайте точкова диаграма 1, като разсейване напред срещу странично разсейване, за да получите цялата левкоцитна популация, както е показано на Фигура 1. По време на събирането на пробите се уверете, че левкоцитната популация е разделена на три отделни популации (лимфоцити, моноцити и гранулоцити) на FSC/SSC точковата диаграма. Регулирайте усилването (усилването) на FSC и SSC сигналите, за да получите разпределение, както е показано на Фигура 1. За инструкции се обърнете към ръководствата на продукта на проточния цитометър.
- Създайте точкова графика 2, като CCR3-PE срещу странично разсейване, както е показано на Фигура 2. Задайте гейт (напр. базофили), включващ цялата популация на базофили като CCR3^{pos} и SSC^{low}, както е показано с правоъгълния гейт на Фигура 2. Еозинофили, които също са CCR3^{pos}, трябва да бъдат изключени въз основа на високия SSC.
- Създайте точкова диаграма 3, като CD63-FITC срещу CCR3-PE, показваща само затворените базофили, както е показано на Фигура 3. Използвайте нестимулираните базофили в покой на епруветката на фона на пациента (PB), за да зададете квадрантна врата, включително CD63 отрицателни базофилни клетки в долния десен квадрант (CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{low}), както е показано на Фигура 3. Базофилите, активирани чрез стимулиране на положителни контроли и специфични алергени, ще

доведат до CD63 положителна базофилна популация (CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}), идентифицирана в горната част десен квадрант, както е показано на фигура 4 с пример за стимулация с положителна контрола (STCON).

Отчитането на анализа е посочено като съотношението на CD63 положителни базофили спрямо всички базофили (%CD63 активирани), както е идентифицирано в квадранта на точковата графика 3 за всяка от епруветките за стимулация.

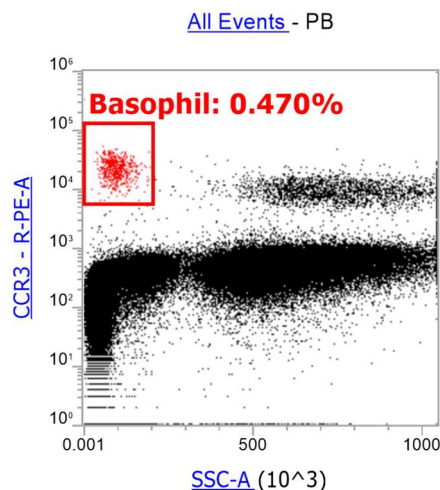


Фигура 1: Три отделни популации (лимфоцити, моноцити и гранулоцити) върху FSC/SSC точков график.

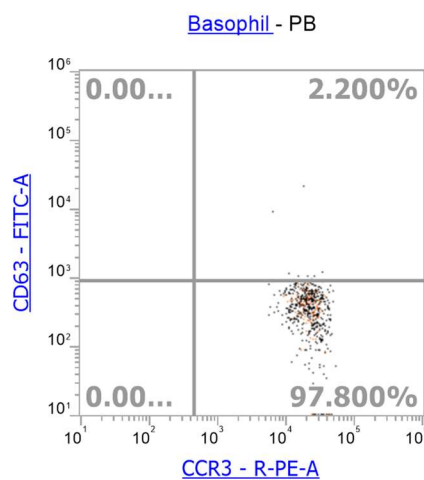
Вземете 500 или повече базофилни клетки за всякакви тръби за стимулация (отделени, както е показано на точков график 2, Фигура 2 по-долу). Ако се придобият по-малко от 300 базофилни клетки (напр. в случай на базопения), резултатите от теста не могат да бъдат оценени.

АНАЛИЗ НА ДАННИ

Получените данни се анализират с подходящ софтуер за анализ на поточна цитометрия. Задайте подобни точкови диаграми и врати, както е направено за придобиването. Гейтовете, които идентифицират базофилите в точков график 2, могат да бъдат независимо адаптирани във всяка от различните стимулации за една и съща пациентска проба. За правилната оценка и стандартизиране на резултатите се определя фонова настройка за всеки отделен пациент, като се използва фоневата стимулация на пациента (PB). Вратата на квадранта, зададена на точковата графика 3, трябва да бъде дефинирана, зададена на PB. За стандартизиране на анализа стробирането е настроено да бъде между 2 и 2,5% активирани базофили в PB пробата на всеки пациент (вижте Фигура 3). Тази врата трябва да се приложи към всички последващи стимулации за същите пациенти (PC1, PC2 и всички измерени алергени), за да се изчисли процентът на CD63 положителни клетки при всяка стимулация (вижте Фигура 4).

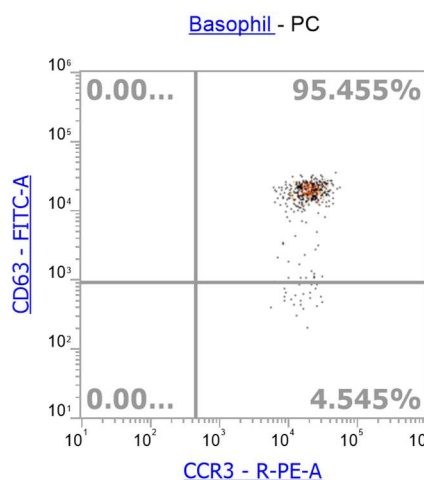


Фигура 2: Селекция на базофилни клетки CCR3^{pos} / SSC^{low}



Затворен район	Броя (n=)	%
Общо	125'864	100,0
Базофилите	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{neg})	578	97,8

Фигура 3: История на пациента (PB) само с STB



Затворен район	Броя (n=)	%
Общо	130'926	100,0
Базофилите	506	0,39
Q2 (CD63 ^{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 ^{neg})	23	4,5

Фигура 4: Контрол на стимулацията (STCON)

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

За валиден резултат трябва да бъдат изпълнени следните критерии и мерки за контрол на качеството:

Левкоцитни популации: Обикновено три отделни левкоцитни популации лимфоцити, моноцити и гранулоцити трябва да се появяват в диаграмата на FSC/SSC (вижте Фигура 1). Появата им може да се разглежда като критерий за качеството на кръвната проба (времева рамка между вземането на пробата и извършването на анализа, условия на съхранение). Резултатите от теста не могат да бъдат оценени, ако са придобити по-малко от 300 базофили.

Стимулирането (положително) контролира анти-FcεRI mAb и fMLP: Анти-FcεRI mAb имитира свързването на рецептора, причинено от алергена *in vivo*. fMLP е трипептид, причиняващ базофилно активиране по неимунологичен начин.

- Ако анти-FcεRI mAb контролата показва стойност от $\geq 10\%$ активирани базофили, пробите могат да бъдат оценени.
- Ако само fMLP контролата показва сигнал $\geq 10\%$, но анти-FcεRI mAb не показва, анализът е извършен правилно, но резултатите от теста не могат да бъдат оценени. Пациентът се счита за IgE неотговорил.
- Ако и анти-FcεRI mAb, и fMLP показват стойности $<10\%$ активирани базофили, вероятно е техническа грешка. Резултатът от теста трябва да се счита за невалиден и тестът да се повтори.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Flow CAST® открива популацията от базофили, експресиращи CD63 клетъчния повърхностен маркер като % от общия брой базофили. Няма международно или национално признати референтни материали или референтни процедури за измерване за този анализ.

Възпроизводимостта от партида към партида е гарантирана чрез титруване на анти-CD63-FITC и анти-CCR3-PE конюгати на моноклонални антитела срещу калибриращи перли. За оценка на вариацията от партида до партида, моля, вижте резултатите за възпроизводимост в раздел „Характеристики на работа“.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Резултатите от теста Flow CAST® трябва да се интерпретират във връзка с други клинични и лабораторни находки.
- За определяне на алергични разстройства, свързани с лекарства, тестът за ВАР трябва да се извърши в рамките на 6 месеца от алергичната реакция (реф. 8).
- Уверете се, че са изминали поне една до две седмици след алергична реакция, преди да извършите ВАР тест (реф. 8).
- Отрицателните резултати, получени за лекарствени алергени, не трябва да се използват за изключване на алергия.
- Очаква се 5 до 10% от пациентите да не отговарят на IgE. При тези пациенти няма да се наблюдава повишена регулация на експресията на CD63 и положителен резултат. Неотговарящите могат да бъдат идентифицирани с помощта на контроли за стимулация, предоставени с теста Flow CAST® (реф. 9).
- Недостатъчно напълнени епруветки с K-EDTA (напълнени по-малко от половината) могат да доведат до фалшиво отрицателни резултати.
- Очаква се интерференция с резултатите от теста Flow CAST® при пациенти на терапия с омализумаб (XOLAIR®) (реф. 10).
- Системно прилаганите антиалергични лекарства като кортикостероиди, хромоглицинова киселина (DSCG) трябва да се избягват поне 24 часа преди вземането на кръвна проба.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Категориите резултати на Flow CAST® са следните:

Резултат	Интерпретация
< cut-off	Отрицателен
\geq cut-off за едното или и двете разреждания на алергена.	Положителен

Таблица 3

CUT-OFF И РЕФЕРЕНТЕН ИНТЕРВАЛ

Установена е техническа граница от 5% активирани базофили, където резултатите $\geq 5\%$ CD63^{pos} показват активиране на базофили.

За всеки алерген се постига подобрена специфичност чрез използване на специфичните за алергена граници, както е посочено в брошурите за BÜHLMANN Алергени.

Референтните интервали са установени съгласно CLSI C28-A3. Сто и двадесет (120) кръвни проби от център за кръводаряване бяха стимулирани със стимулиращ буфер или анти-FcεRI mAb и тествани съгласно стандартни протоколи и протоколи за лизиране без промиване. Тестването е извършено в продължение на 26 дни от трима оператори с две партии реагенти Flow CAST®.

Контрол	Анализ протокол	Референтен интервал (90% CI) [% CD63 ^{pos}]	
		2,5th процентил	97,5th процентил
Стимулиращ буфер	стандартен	0,8 (0,5 - 1,2)	4,6 (4,1 - 6,4)
	лизис-без измиване	0,9 (0,6 - 1,0)	4,2 (3,9 - 5,3)
анти-FcεRI mAb	стандартен	18,0 (11,5 - 26,0)	97,7 (96,0 - 98,5)
	лизис-без измиване	13,2 (11,4 - 21,2)	96,4 (94,3 - 97,3)

Таблица 4

КЛИНИЧНО ИЗПЪЛНЕНИЕ

Клиничното действие на Flow CAST® беше оценено в систематичен преглед на научната литература. Единадесет рецензирани проучвания, идентифицирани при систематично търсене на литература, обхващащо период от време до ноември 2019 г., едно проучване за отрови от насекоми, които не са идентифицирани при първоначалното търсене, и две проучвания за фъстъчени алергени, публикувани след 2019 г., бяха включени в анализа. Проучванията изследват способността на Flow CAST® да прави разлика между субекти с алергични заболявания и неалергични субекти. Алергичните разстройства при алергичния субект са потвърдени от а) клинична история на пациента, б) орално провокиране с храна (OFC) или провокационен тест, в) клинична история и лабораторни изследвания (кожно убождане - SPT, sIgE) или г) клинична история и OFC/провокационен тест. Проучвания, използващи sIgE или SPT като единствена клинична референция, бяха изключени. Резултатите са обобщени в таблица 5.

Група алергени	N проучвания	Чувствителност Медиана (обхват)	Алергични субекти (общо)	Специфичност Медиана (обхват)	Контролни предмети (общо)
Храни Инхалатори	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Отрови от насекоми	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Лекарства	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Таблица 5

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА РАБОТА

Вътрешнолабораторна прецизност: $\leq 25\%$ CV за стимул

Повторяемостта (в рамките на серия) и вътрешнолабораторната прецизност са установени въз основа на ръководството на CLSI EP05-A3 и ISO стандарт 15197:2013. Четири проби от донорска кръв бяха стимулирани с буфер за стимулиране или контрол на стимулацията анти-FcεRI mAb. За стандартната процедура беше използван дизайн на изследване с 2 оператора x 4 дни x 1 цикъл x 4 повторения. За лизиране без промиване беше приложен дизайн на изследване с 2 оператора x 1 ден x 4 серии x 4 реплики. Репликата съответства на независима реакция на стимулация и пълна процедура за анализ. Резултатите за анти-FcεRI mAb за контрол на стимулацията са обобщени в Таблица 6.

Анализ протокол	Донор	Значение [%CD63]	n	В серия [%CV]	Между дните (A)	Общо [%CV]
					Между пусканията (B) [%CV]	
Стандарт (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%
лизис-без измиване (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%

Таблица 6

Възпроизводимост: $\leq 25\%$ CV за стимул

Възпроизводимостта е установена въз основа на ръководството на CLSI EP05-A3 и ISO стандарт 15197:2013. Четири проби от донорска кръв бяха стимулирани с буфер за стимулиране или контрол на стимулацията анти-FcεRI mAb. Пробите бяха анализирани в две лаборатории съгласно стандартния протокол. Беше приложен дизайн на изследване с 3 инструмента/партиди x 2 оператора x 1 ден x 5 повторения. Репликата съответства на независима реакция на стимулация и пълна процедура за анализ. Резултатите за анти-FcεRI mAb за контрол на стимулацията са обобщени в Таблица 7.

Донор	Значение [%CD63]	n	В серия [%CV]	Между-оператор [%CV]	Между лот/инструмент [%CV]	Общо [%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%

Таблица 7

ИНТЕРФЕРИРАЩИ ВЕЩЕСТВА

Чувствителността на анализа Flow CAST® към фармацевтични продукти, необичайни кръвни състояния и добавката на пробата K-EDTA беше оценена съгласно насоките EP07-A2 на CLSI. Отклонение в резултатите, надвишаващо 20% за контрол на стимулацията анти-FcεRI mAb и 20% CD63^{pos} (абсолютно) за контрол на стимулацията fMLP, се счита за интерференция. Не са открити смущения при посочените концентрации с веществата, изброени в таблица 8, при посочените концентрации. Открита е интерференция с K-EDTA при двойна концентрация на K-EDTA във венепункционна тръба за един донор.

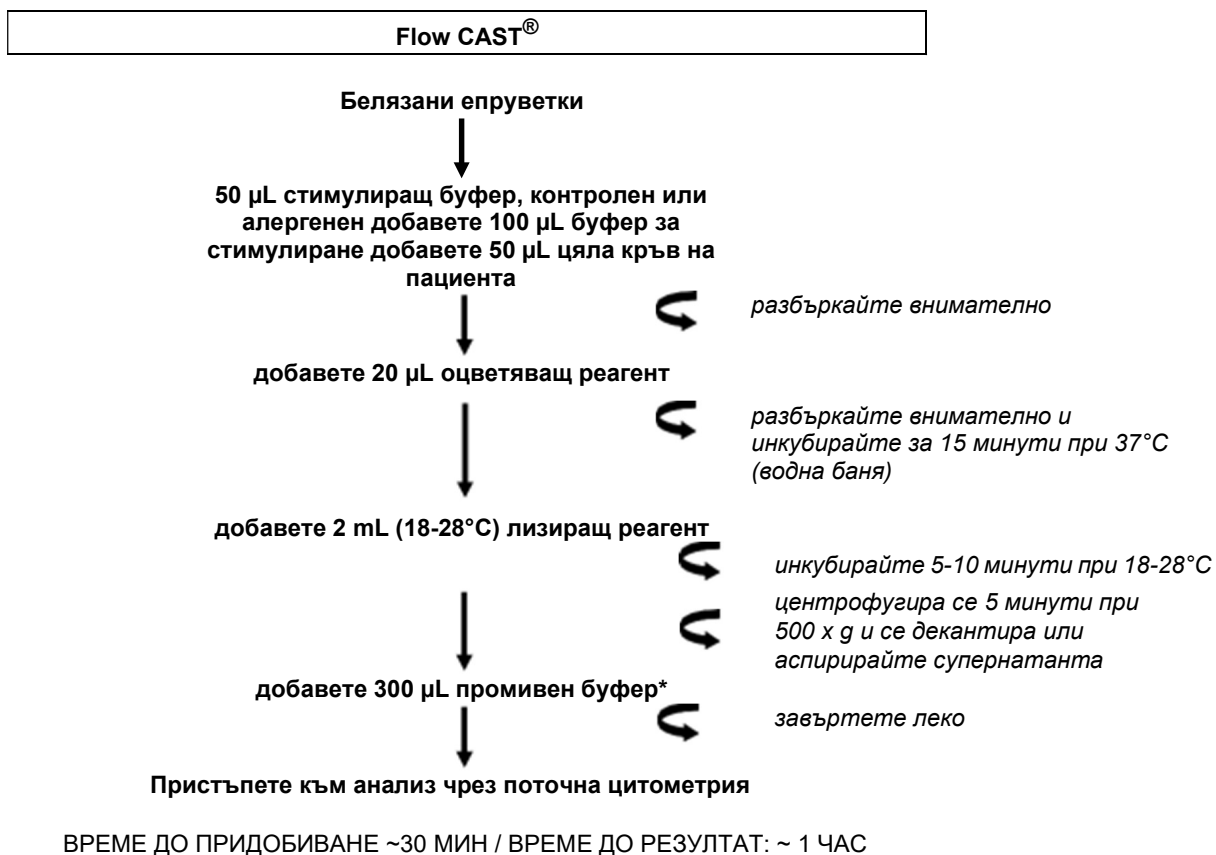
Активен компонент	Тестова концентрация [µg/mL]
Fexofenadine hydrochloride	1,6
Cetirizine dihydrochloride	4,35
Hydroxyzine dihydrochloride	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednisone	1,2
N-Acetyl-L-tryptophan	30
Triglyceride (Intralipid)	20'000
Bilirubin свързан	400
Bilirubin несвързан	400
Хемолиза	56'100

Таблица 8

ЛИТЕРАТУРА

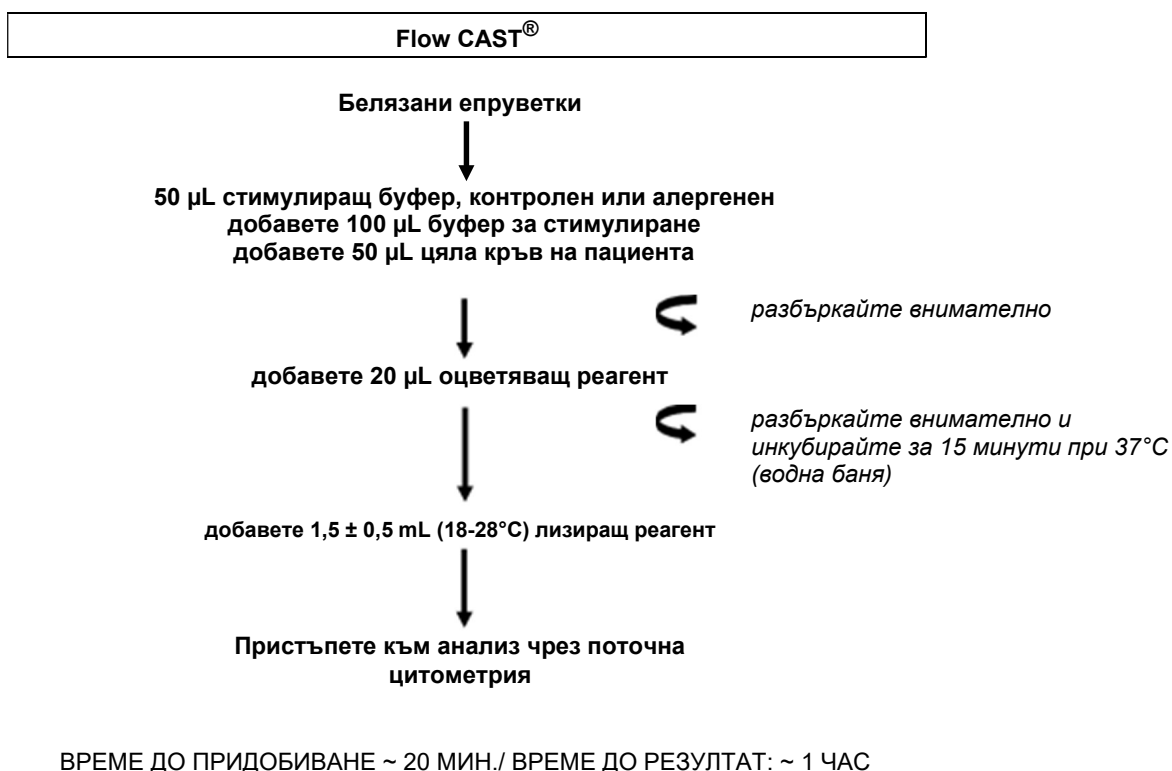
1. Sainte-Laudy, J, et al. [Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis]. *Allerg Immunol (Paris)* 26, 211-4. (1994).
2. Sabbah, A and Sainte-Laudy, J. Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation.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

СТАНДАРТЕН ПРОТОКОЛ: ЛИЗИРАНЕ И ИЗМИВАНЕ



* Забележка: В зависимост от използваната апаратура за поточен цитометър, количеството промивен буфер трябва да се адаптира по отношение на мъртвия обем и плътността на клетките, съвместими с инструмента.

АЛТЕРНАТИВЕН ПРОТОКОЛ: ПРОТОКОЛ ЗА ЛИЗИРАНЕ-БЕЗ ИЗМИВАНЕ



ИСТОРИЯ НА ПРОМЕНИТЕ

Дата	Версия	Промяна
2023-06-21	A2	Преформулиране в глава <i>Анализ на данни и Клинично изпълнение</i> Включване на номер на нотифициран орган към CE-маркировката – процедура за оценка на съответствието съгласно IVDR 2017/746

ДОКЛАДВАНЕ ЗА ИНЦИДЕНТИ В ДЪРЖАВИТЕ-ЧЛЕНКИ НА ЕС

Ако е възникнал сериозен инцидент във връзка с това устройство, моля, уведомете незабавно производителя и компетентния орган на вашата държава-членка.

ПОВРЕЖДЕНИЯ ОТ ПРАТКАТА

Моля, уведомете вашия дистрибутор, ако този продукт е получен повреден.

СИМВОЛИ

BÜHLMANN използва символите и знаците, изброени и описани в ISO 15223-1. Освен това се използват следните символи и знаци:

Символ	Обяснение
BUF STIM	Стимулиращ буфер
CONTROL STIM	Контрол на стимулацията
CONTROL FMLP	Контрол на стимулацията fMLP
REAG STAIN	Оцветяващ реагент
REAG LYS	Лизиращ реагент
BUF WASH	Измиващ буфер

