



Flow CAST[®]

Test aktivace bazofilů (BAT)
Průtoková cytometrie

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Testy FK-CCR100

Datum vydání: 2023-06-21
Verze A2



Výrobce

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

URČENÉ POUŽITÍ

BÜHLMANN Flow CAST® je *in vitro* diagnostický test pro kvalitativní hodnocení aktivace bazofilů při stimulaci specifickými alergeny. Test využívá průtokovou cytometrii ke stanovení populace bazofilů exprimujících povrchový buněčný marker CD63 ve vzorcích plné krve pacienta K-EDTA. Flow CAST® je určen jako pomůcka pro diagnostiku alergických poruch bezprostředního typu ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními nálezy. Pouze pro laboratorní účely.

PRINCIP TESTU

Flow CAST® je test aktivace bazofilů založený na průtokové cytometrii (viz 1, 2). Plná krev pacientů je stimulována specifickými alergeny, stejně jako stimulační pufr a stimulační kontroly, aby bylo možné vyhodnotit degranulaci bazofilů pacienta *ex vivo*. Vzorek se barví pomocí dvou fluorescenčně značených monoklonálních protilátek: jedna pro selekci bazofilů (anti-CCR3-PE) a druhá pro stanovení stavu aktivace bazofilů (anti-CD63-FITC) (viz 3-6). CD63 je transmembránový protein přítomný na intracelulárních vezikulách a na povrchu buněk se prezentuje až po degranulaci bazofilů (viz 7).

Erytrocyty ze vzorku pacienta se odstraní lyzující reakcí. V závislosti na protokolu se buňky odstředí, resuspendují v promývacím pufru a fixují pro pozdější analýzu průtokovou cytometrií nebo se analyzují přímo po lýze. Bazofily jsou z populace leukocytů vyčleněny jako CCR3^{pos} /SSC^{low}. Aktivační stav gatovaných bazofilů se určuje podle jejich exprese CD63 (aktivační marker). Pacienti, kteří nemají alergické reakce zprostředkovaným IgE, tzv. non-respondéři, jsou identifikováni na základě výsledků pozitivních kontrol. Výsledek testu se udává jako poměr CD63 pozitivních bazofilů ke všem bazofilům (% aktivace CD63).

DODANÁ REAGENCIE A PŘÍPRAVA

Reagencie	Množství	Kat.č.	Komentáře
Stimulační pufr obsahující vápník, heparin a IL-3	1 lahvička lyofilizovaná	B-CCR-STB	Rekonstituujte 50 mL vody ¹⁾
Stimulační kontrola anti-FcεRI mAb	1 lahvička lyofilizovaná	B-CCR- STCON	Rekonstituujte 1,5 mL B-CCR- STB
Stimulační kontrola fMLP ²⁾	1 lahvička lyofilizovaná	B-CCR-FMLP	Rekonstituujte 1,5 mL B-CCR- STB
Barvicí činidlo Směs anti-CD63-FITC a anti-CCR3-PE mAb	1 lahvička 2,2 mL	B-CCR-SR	Připraveno k použití
Lyzovací činidlo ³⁾ 10x koncentrované	1 lahvička 25 mL	B-CCR-LYR	Zředte 225 mL deionizované vody
Promývací pufr s 0,1% formaldehydem	1 lahvička 100 mL	B-CCR-WB	Připraveno k použití

Tabulka 1

¹⁾ Požadovaná kvalita vody je uvedena v kapitole Technická opatření.

²⁾ N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin

³⁾ Při skladování při teplotě 2-8 °C se mohou tvořit krystaly, které je třeba před zředěním rozpustit při teplotě 18-28 °C.

SKLADOVÁNÍ A ŽIVOTNOST REAGENCIÍ

Neotevřená reagencie	
Skladovat při teplotě 2-8 °C. Nepoužívat proexpirované reagencie.	
Otevřená činidla a rekonstituovaná činidla	
Stimulační pufr	Stabilita při -20 °C po dobu 6 měsíců. Pokud se očekává opakované použití, aliquotujte.
Stimulační kontrola	
Stimulační kontrola fMLP	
Lyzovací činidlo	Stabilita při 2-8 °C po dobu 6 měsíců.
Barvicí činidlo	
Promývací pufr	

Tabulka 2

POŽADOVANÉ MATERIÁLY NEDODÁVANÉ SE SOUPRAVOU

- Venepunkční zkumavky K-EDTA
- Odstředivka
- Jednorázové polypropylenové nebo polystyrenové zkumavky pro průtokovou cytometrii bez obsahu pyrogenů.
- Stojánky na zkumavky pro průtokovou cytometrii pro stimulaci
- Vortexový mixér
- (volitelné) mikrotitrační destičky pro tkáňové kultury ke stimulaci buněk a barvení u standardního protokolu.
- (volitelné) hluboké jamky pro stimulaci buněk, barvení, lýzu a průtokovou cytometrii pro protokol bez lyzovacího činidla.
- Přesné pipety s jednorázovými špičkami bez obsahu pyrogenu:
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - 1-5 mL nastavitelná pipeta a
 - Volitelné: nastavitelný dávkovač 10-50 µL
- 50 mL láhev pro rekonstituci stimulačního pufru
- Sterilní, ultračistá a apyrogenní voda pro rekonstituci stimulačního pufru (viz kapitola Technická bezpečnostní opatření).
- Vodní lázeň (doporučeno) nebo inkubátor nastavený na 37 °C
- Destilovaná nebo deionizovaná voda a vhodné laboratorní sklo pro ředění lyzovacího činidla.
- Víčka nebo parafilm k zakrytí zkumavek během inkubace
- Dávkovače na lyzovací činidlo a promývací pufr v lahvičkách
- Průtokový cytometr vybavený modrým laserovým zdrojem 488 nm a emisními filtry pro detekci PE a FITC.
- Software pro průtokovou cytometrickou analýzu (viz kapitola Získávání průtokových cytometrických dat).

ALERGENY JE TŘEBA OBJEDNAT ZVLÁŠŤ

Alergeny validované pro Flow CAST® nabízí společnost BÜHLMANN samostatně. Objednací kódy alergenů, jakož i informace o přípravě alergenů naleznete v brožurách o alergenech BÜHLMANN na webových stránkách společnosti BÜHLMANN:

www.buhmannlabs.ch

Důležité: Flow CAST® byl testován pouze v kombinaci s CAST® Allergens, který je k dispozici v BÜHLMANN Laboratories AG. Za validaci použitých alergenů získaných z jiných zdrojů odpovídá výhradně laboratoř.

OPATŘENÍ

Bezpečnostní opatření

- Stimulační pufr (B-CCR-STB) tohoto testu obsahuje složky lidského původu. Přestože byly testovány a sledány negativními na povrchový antigen HBV, HCV a protilátky HIV1/2, mělo by se s činidly zacházet, jako by mohla přenášet infekce, a mělo by se s nimi zacházet v souladu se správnou laboratorní praxí (GLP) za použití vhodných bezpečnostních opatření.
- Zabraňte kontaktu činidel s kůží, očima nebo sliznicemi. Dojde-li ke kontaktu, okamžitě je omyjte velkým množstvím vody.
- S činidly a chemikáliemi se musí zacházet jako s nebezpečným odpadem podle národních bezpečnostních směrnic nebo nařízení o biologickém nebezpečí.

Technická opatření

- Doporučená kvalita vody pro zařízení Flow CAST®: Použití sterilní, ultračisté a apyrogenní vody k rekonstrukci stimulačního pufu (B-CCR-STB) je nezbytné pro dobrou a reprodukovatelnou stimulaci bazofilů. Lze použít následující zdroje vody: vodu pro buněčné kultury, infuzní vodu nebo deionizovanou, dvakrát destilovanou vodu, která je ultrafiltrována v pravidelně sanitovaném ultrafiltru 10 kDa.
- Lyzovací činidlo (B-CCR-LYR) lze rekonstituovat deionizovanou, dvakrát destilovanou vodou nebo vodou stejné kvality, jaká se používá pro rekonstrukci stimulačního pufu.
- Během buněčné stimulace se vyhněte kontaminaci alergenů: Aeroalergenů v laboratoři mohou kontaminovat otevřené vzorky krve a buněčné suspenze a způsobit zvýšené pozadí. Krevní vzorky a zkumavky pro buněčnou stimulaci musí být pečlivě zakryty víčky nebo parafilmem. V laboratoři, kde se provádí buněčná stimulace, se vyhýbejte roztočům domácího prachu, opylujícím rostlinám, latexovým rukavicím nebo vybavení potenciálně obsahujícím latex a také otevřeným oknům. Doporučuje se provádět kroky přípravy buněk a stimulace v laboratorní komoře s laminárním prouděním.
- V porovnání s inkubátorem se doporučuje vodní lázeň, a to z důvodu účinnějšího přenosu tepla. Pokud používáte inkubátor, ověřte, zda je teplota 37 °C. Nižší nebo vyšší teploty mohou ovlivnit výsledky.
- U alergenů léčiv se obecně očekává nízká úroveň aktivace bazofilů. Proto je zásadní, aby bylo při stimulaci dosaženo optimálních podmínek včetně teploty. Pro lékové alergenů se doporučuje používat jednotlivé zkumavky namísto hlubokých jamek.
- Složky se nesmí používat po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích.
- Nemíchejte různé šarže činidel.
- Zabraňte kontaminaci činidel.

Postup testu

- Vyrovnejte lyzovací činidlo na pokojovou teplotu (18-28 °C).
- Před provedením testu si pečlivě přečtete pokyny. Pokud jsou činidla nesprávně ředěna, je s nimi nesprávně manipulováno nebo jsou skladována za jiných podmínek, než jsou uvedeny v tomto návodu k použití, bude to mít nepříznivý vliv na výsledky testu.
- Vzorky, se kterými není správně manipulováno, mohou způsobit nepřesné výsledky.
- Ověřte přípravky pohledem, abyste posoudili účinnost lýzy. Erytrocyty mohou být neúplně lyzovány a objevit se na světelném difrakčním bodovém grafu na stejném místě jako leukocyty.
- Prodloužená doba lýzy může vést ke ztrátě buněk. Ujistěte se, že máte k dispozici alespoň 300 bazofilů pro získání dat. Doporučujeme, aby akvizice vzorků zpracovaných protokolem bez lyzovacího činidla, byla provedena do jedné hodiny.
- Průtoková cytometrie může poskytovat falešné výsledky, pokud: cytometr je špatně nastaven, emise fluorescence nebyla vhodně kompenzována, oblasti vstupu nebyly pečlivě umístěny.

ODBĚR A SKLADOVÁNÍ

Doporučuje se, aby se pacienti nejméně 24 hodin před odběrem krve vyhnuli systémově podávaným antialergickým lékům, jako jsou kortikosteroidy, kyselina chromoglyková (DSCG).

Odebírejte krev do **venepunkčních zkumavek s K-EDTA** a naplňte zkumavky až po značku vyhrazeného objemu. Zkumavky musí být naplněny alespoň do poloviny. Jeden (1) mL plné krve vystačí přibližně na 18 zkumavek.

Vzorky krve neodstředějte ani nemrazte.

Plná krev

Vzorky plné krve uchovávané při teplotě 2-8 °C by měly být zpracovány do 48 hodin od odběru.

Pro stanovení alergických poruch na léčiva se doporučuje zpracovat vzorky okamžitě, nejpozději do 24 hodin po odběru.

Vzorky plné krve lze uchovávat také při pokojové teplotě (teplota do 28 °C). Musí však být zpracovány do 24 hodin od odběru pomocí standardního protokolu nebo v den odběru pomocí protokolu bez lyzovacího činidla.

Zpracované vzorky

Buňky zpracované podle standardního protokolu jsou fixovány. Fixované buňky lze skladovat při teplotě 2-8 °C po dobu 5 dnů chráněné před světlem pro následné získání průtokovou cytometrií.

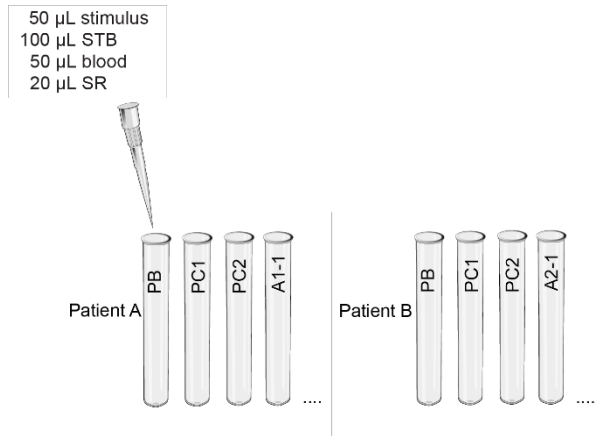
POSTUP ANALÝZY

1. Promíchejte protisrážlivý vzorek krve opakovaným převrácením venepunkční zkumavky.
2. Připravte si čerstvé standardní polypropylenové nebo polystyrenové zkumavky pro průtokovou cytometrii, které neobsahují pyrogen.
3. U každého pacienta označte zkumavky *např.* takto:
PB = pozadí pacienta
PC1 = stimulační kontrola s anti-FcεRI Ab

PC2 = kontrola stimulace pomocí fMLP

A1-1 pro alergen 1 s ředěním 1

A1-2 pro alergen 1 s ředěním 2 atd.



Stimulace a barvení

- Do každé zkumavky přidejte 50 µL příslušného stimulantu:
PB zkumavka: (pozadí pacienta): 50 µL **stimulačního pufru** (pozadí pacienta)
Zkumavka PC1: 50 µL **stimulační kontroly** anti-FcεRI mAb
Zkumavka PC2: 50 µL **stimulační kontroly** fMLP
Ax-y zkumavka: 50 µL **alergenu**
- Do každé zkumavky přidejte 100 µL stimulačního pufru (STB).
- Do každé zkumavky přidejte 50 µL plné krve pacienta. Ujistěte se, že na boční a horní straně zkumavky není krev.
- Jemně promíchejte.
- Do každé zkumavky přidejte 20 µL barvicího činidla (SR).
- Jemně promíchejte, zkumavky zakryjte a inkubujte 15 minut při 37 °C ve **vodní lázni**.

Poznámka: Pokud se místo vodní lázně použije inkubátor, doba inkubace se prodlouží na 25 minut z důvodu méně účinného přenosu tepla.

Lyzování

Poznámka: Lyzovací činidlo musí být vyrovnáno na pokojovou teplotu (18-28 °C).

Standardní protokol: Lýza a promytí

- Do každé zkumavky přidejte 2 mL ekvilibrovaného (18-28 °C) lyzovacího činidla a jemně promíchejte.
- Inkubujte 5-10 minut při teplotě 18-28 °C.
- Zkumavky odstředíte 5 minut při 500 x g.
- Supernatant dekantujte pomocí blotovacího papíru.
- Resuspendujte buněčný pelet 300 µL promývacího pufru (fixační prostředek je součástí promývacího pufru).

Poznámka: Množství promývacího pufru lze přizpůsobit konkrétnímu použitému přístroji průtokového cytometru podle mrtvého objemu a hustoty buněk kompatibilních s tímto přístrojem.

- Jemně vortexujte.

Bud' 16a.zpracujte vzorky na průtokovém cytometru.

Nebo 16b.pokud nejsou získány okamžitě, nechte vzorky inkubovat 30 minut při RT a chraňte je před světlem (fixace).

Vzorky skladujte uzavřené a chráněné před světlem při teplotě 2-8 °C až do měření. Fixované buňky lze skladovat při 2-8 °C po dobu 5 dnů pro následné zpracování testu průtokovou cytometrií. Před prací jemně promíchejte zkumavky se vzorky.

Poznámka : Uložené fixní vzorky lze kdykoli zpracovat bez jakékoli předběžné úpravy. Doba skladování je uvedena v části "Odběr a skladování vzorků". Po delším skladování může být pozorován mírný pokles intenzity fluorescence a nižší výťažnost bazofilů $\geq 80\%$.

Alternativní protokol: Protokol Lyse-no-wash

Nová generace vysoce výkonných průtokových cytometrů dokáže analyzovat lyzované, nepromyté vzorky. Tento postup musí být přizpůsoben použitému přístroji průtokového cytometru a může vyžadovat optimalizaci. Níže uvedený protokol vychází z údajů získaných na průtokovém cytometru Attune NxT (Thermo Fisher).

- Provedte kroky 1 až 9 (výše) a poté pokračujte krokem 10. Do každé zkumavky přidejte $1,5 \pm 0,5$ mL ekvilibrovaného (18-28 °C) lyzovacího činidla a jemně promíchejte (objem je třeba optimalizovat v závislosti na rychlosti akvizice použitého průtokového cytometru).

- Zpracujte vzorky na vhodném průtokovém cytometru s vysokou rychlostí, aby doba analýzy byla co nejkratší.

Poznámka: Vzorky by měly být analyzovány do 24 hodin od obdržení vzorku. Viz "Odběr a skladování vzorků".

ZÍSKÁVÁNÍ PRŮTOKOVÝCH CYTOMETRICKÝCH DAT

Průtokovou cytometrii lze provádět na jakémkoli průtokovém cytometru pracujícím s argonovou laserovou diodou 488 nm (modrozelené excitační světlo).

Průtokový cytometr musí být vybaven pro detekci přímého rozptylu (FSC), bočního rozptylu (SSC) a dvou fluorochromových kanálů FITC a PE.

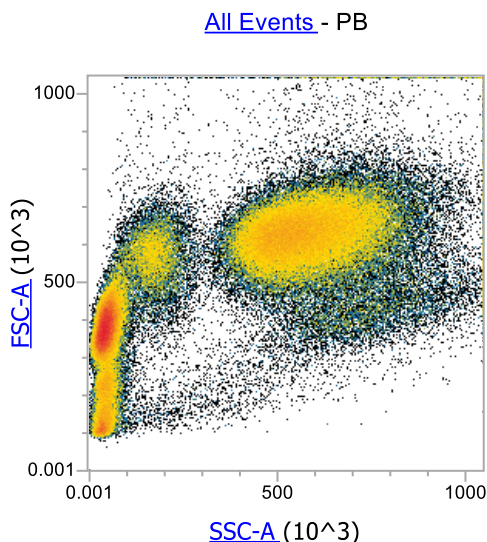
Zkontrolujte, zda je průtokový cytometr správně seřízen a zda je nastavena kompenzace barev.

Pro vhodné získání a charakterizaci klidových a aktivovaných bazofilů vytvořte následující bodový graf :

- Vytvořte bodový graf 1 jako přímý rozptyl vs boční rozptyl, abyste získali celou populaci leukocytů, jak je znázorněno na obrázku 1. Během získávání vzorků se ujistěte, že je populace leukocytů na bodovém grafu FSC/SSC rozdělena na tři samostatné populace (lymfocyty, monocyty a granulocyty). Upravte zesílení (zisk) signálů FSC a SSC tak, abyste získali rozložení podle obrázku 1. Pokyny naleznete v příručkách k produktům průtokového cytometru.
- Vytvořte bodový graf 2, jako CCR3-PE vs boční rozptyl, jak je znázorněno na obrázku 2. Nastavte vstup (např. bazofily) zahrnující celou populaci bazofilů jako CCR3^{pos} a SSC^{low}, jak je znázorněno u obdelníkového vstupu na obrázku 2. Eozinofily, které jsou také CCR3^{pos}, je třeba vyloučit na základě vysoké SSC.
- Vytvořte bodový graf 3, jako CD63-FITC vs CCR3-PE, který zobrazuje pouze bazofily se vstupem, jak je znázorněno na obrázku 3. Použijte nestimulované, klidové bazofily ze zkumavky na pozadí pacienta (PB) k nastavení kvadrantové brány zahrnující CD63 negativní buňky bazofilů v pravém dolním kvadrantu (CD63^{neg} CCR3^{pos} /SSC^{low}), jak je znázorněno na obrázku 3. Výsledkem aktivace bazofilů stimulací pozitivními

kontrolami a specifickými alergeny bude CD63 pozitivní populace bazofilů (CD63 /CCR3^{pospos} /SSC^{low}) identifikovaná v pravém horním kvadrantu, jak ukazuje obrázek 4 s příkladem stimulace pozitivní kontrolou (STCON).

Výsledek testu je uveden jako poměr CD63 pozitivních bazofilů vůči všem bazofilům (% aktivace CD63), jak je uvedeno v kvadrantové bráně bodového grafu 3 pro kteroukoli stimulační zkumavku.



Obrázek 1: Tři diskretní populace (lymfocyty, monocyty a granulocyty) na bodovém grafu FSC/SSC.

Získejte 500 nebo více bazofilních buněk pro libovolné stimulační zkumavky (rozdělené podle bodového grafu 2, obrázek 2 níže). Pokud je získáno méně než 300 bazofilních buněk (např. v případě bazopenie), výsledky testu nelze vyhodnotit.

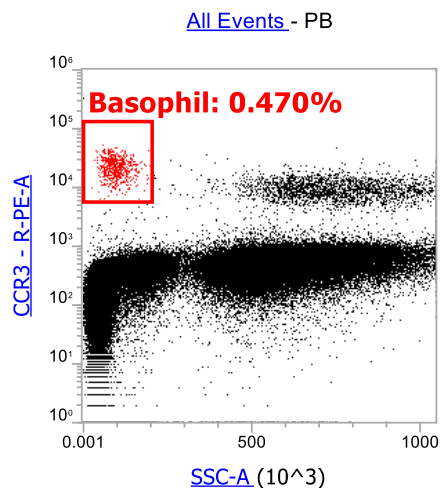
ANALÝZA DAT

Získaná data se analyzují pomocí příslušného softwaru pro analýzu průtokové cytometrie. Nastavte podobné bodové grafy a gaty jako při akvizici.

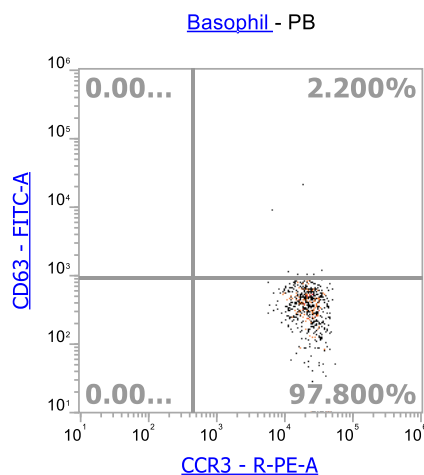
Gaty, které identifikují bazofily v bodovém grafu 2, mohou být nezávisle upraveny v kterékoli z různých stimulací pro stejný vzorek pacienta.

Pro správné vyhodnocení a standardizaci výsledků je pro každého jednotlivého pacienta definováno nastavení pozadí pomocí stimulace pozadí pacienta (PB). Kvadrantový gate nastavený na bodovém grafu 3 musí být definován na PB. Pro standardizaci analýzy je gate nastaven na hodnotu mezi 2 a 2,5% aktivovaných bazofilů ve vzorku PB každého pacienta (viz obrázek 3).

Tento gate je třeba použít pro všechny následné stimulace stejných pacientů (PC1, PC2 a všechny měřené alergeny), aby se vypočítalo procento CD63 pozitivních buněk v každé stimulaci (viz obrázek 4).

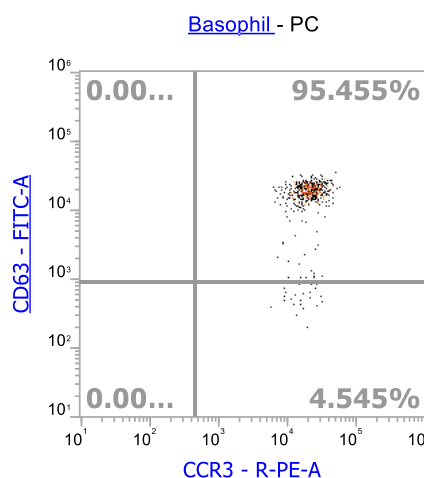


Obrázek 2: Výběr bazofilních buněk CCR3^{pos} / SSC^{low}



Uzavřená oblast	Počet (n=)	%
Celkem	125'864	100,0
Bazofily	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{negativní})	578	97,8

Obrázek 3: Pozadí pacienta (PB) pouze s STB



Uzavřená oblast	Počet (n=)	%
Celkem	130'926	100,0
Bazofily	506	0,39
Q2 (CD63 ^{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 ^{negativní})	23	4,5

Obrázek 4: Řízení stimulace (STCON)

KONTROLA KVALITY

Pro získání platného výsledku je třeba splnit následující kritéria a opatření pro kontrolu kvality:

Populace leukocytů: V grafu FSC/SSC (viz obrázek 1) by se obvykle měly objevit tři odlišné populace leukocytů: lymfocyty, monocyty a granulocyty. Jejich výskyt lze považovat za kritérium kvality vzorku krve (časový rámec mezi odběrem vzorku a provedením testu, podmínky skladování). Výsledky testu nelze vyhodnotit, pokud je získáno méně než 300 bazofilů.

Stimulační (pozitivní) kontroly anti-FcεRI mAb a fMLP: Anti-FcεRI mAb napodobuje přemostění receptoru způsobené alergenem *in vivo*. fMLP je tripeptid způsobující aktivaci bazofilů neimunologickým způsobem.

- Pokud kontrola Anti-FcεRI mAb vykazuje hodnotu $\geq 10\%$ aktivovaných bazofilů, lze vzorky vyhodnotit.
- Pokud pouze kontrola fMLP vykazuje hodnotu $\geq 10\%$, ale Anti-FcεRI mAb ne, test byl proveden správně, ale výsledky testu nelze vyhodnotit. Pacient je považován za IgE non-respondera.
- Pokud jak Anti-FcεRI mAb, tak fMLP vykazují hodnoty $<10\%$ aktivovaných bazofilů, jedná se pravděpodobně o technickou chybu. Výsledek testu by měl být považován za neplatný a test by měl být opakován.

STANDARDIZACE

Flow CAST® detekuje populaci bazofilů exprimujících povrchový marker CD63 jako % z celkového počtu bazofilů. Pro tento analyt neexistují žádné mezinárodně ani národně uznávané referenční materiály nebo referenční postupy měření.

Reprodukovatelnost jednotlivých šarží je zaručena titrací konjugátů monoklonálních protilátek anti-CD63-FITC a anti-CCR3-PE proti kalibračním kuličkám. Odhad variability mezi jednotlivými šaržemi naleznete ve výsledcích reprodukovatelnosti v části "výkonnostní charakteristiky".

OMEZENÍ

- Výsledky testu Flow CAST® by měly být interpretovány ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními nálezy.
- Pro určení alergických poruch souvisejících s léky by se testování BAT mělo provést do 6 měsíců od alergické reakce (viz 8).
- Před provedením testů BAT se ujistěte, že od alergické reakce uplynuly alespoň jeden až dva týdny (viz 8).
- Negativní výsledky získané na lékové alergeny by neměly být použity k vyloučení alergie.
- Očekává se, že 5 až 10 % pacientů bude IgE non-respondující. U těchto pacientů nebude pozorována zvýšená exprese CD63 a pozitivní výsledek. Non-respondéry lze identifikovat pomocí stimulačních kontrol poskytovaných s testem Flow CAST® (viz 9).
- Nedostatečně naplněné zkumavky K-EDTA (naplněné méně než z poloviny) mohou vést k falešně negativním výsledkům.
- U pacientů léčených omalizumabem (XOLAIR®) se očekává interference s výsledky testu Flow CAST® (viz 10).

- Systémově podávaným antialergenním lékům, jako jsou kortikosteroidy, kyselina chromoglyková (DSCG), je třeba se vyhnout nejméně 24 hodin před odběrem krve.

INTERPRETACE VÝLEDKŮ

Kategorie výsledků Flow CAST® jsou následující:

Výsledek	Výklad
< mezní hodnota	negativní
\geq mezní hodnoty pro jedno nebo obě ředění alergenu.	pozitivní

Tabulka 3

CUT-OFF A REFERENČNÍ INTERVAL

Byla stanovena technická hranice 5 % aktivovaných bazofilů, kdy výsledky $\geq 5\%$ CD63^{pos} ukazují na aktivaci bazofilů.

Pro každý alergen je lepší specifický dosaženo použitím hraničních hodnot specifických pro alergen, jak je uvedeno v brožurách o alergenech BÜHLMANN Allergen Booklets.

Referenční intervaly byly stanoveny podle CLSI C28-A3. Sto dvacet (120) vzorků krve z dárcovského centra bylo stimulováno stimulačním pufrům nebo Anti-FcεRI mAb a testováno podle standardních protokolů a protokolů bez lyzování. Testování bylo prováděno v průběhu 26 dnů třemi operátory se dvěma šaržemi reagentů Flow CAST®.

Kontrola	Test Protokol	Referenční interval (90% CI) [% CD63] ^{pos}	
		2,5 percentilu	97,5 percentilu
Stimulační pufr	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)

Tabulka 4

KLINICKÝ VÝKON

Klinický výkon Flow CAST® byl hodnocen v systematickém přehledu vědecké literatury. Do analýzy bylo zahrnuto jedenáct recenzovaných studií identifikovaných při systematické rešerši literatury zahrnující období do listopadu 2019, jedna studie o hmyzích jedech, která nebyla identifikována při původní rešerši, a dvě studie o alergenech arašídů publikované po roce 2019. Studie zkoumaly schopnost systému Flow CAST® rozlišit osoby s alergickými poruchami od nealergických osob. Alergické poruchy u alergického subjektu byly potvrzeny buď a) klinickou anamnézou pacienta, b) expozičním testem s potravinami (OFC) nebo provokačním testem, c) klinickou anamnézou a laboratorním testem (kožní prick - SPT, slgE) nebo d) klinickou anamnézou a OFC/provokačním testem. Studie používající slgE nebo SPT jako jedinou klinickou referenci byly vyloučeny. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.

Skupina alergenů	N Studie	Citlivost medián (rozmezí)	Alergické subjekty (celkem)	Specifičnost medián (rozmezí)	Kontrolní subjekty (celkem)
Potraviny Inhalační látky	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Hmyzí jedy	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Drogy	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Tabulka 5

VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Přesnost v rámci laboratoře: ≤25% CV na stimulaci

Opakovatelnost (v rámci série) a přesnost v rámci laboratoře byly stanoveny na základě pokynu CLSI EP05-A3 a normy ISO 15197:2013. Čtyři vzorky krve dárců byly stimulovány stimulačním pufrem nebo stimulační kontrolou anti-FcεRI mAb. Pro standardní postup byl použit plán studie 2 operátoři x 4 dny x 1 běh x 4 replikáty. Pro postup lyse-no-wash byl použit plán studie 2 operátoři x 1 den x 4 běhy x 4 replikáty. Replikace odpovídá nezávislé stimulační reakci a úplnému postupu testu. Výsledky pro stimulační kontrolu anti-FcεRI mAb jsou shrnuty v tabulce 6.

Protokol testu	Dárce	Průměr [%CD63]	n	V rámci běhu [%CV]	Mezidenní (A) Mezioběh (B) [%CV]	Celkem [%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%

Tabulka 6

Reprodukovatelnost: ≤25% CV na stimulaci

Reprodukovatelnost byla stanovena na základě pokynu CLSI EP05-A3 a normy ISO 15197:2013. Čtyři vzorky krve dárců byly stimulovány stimulačním pufrem nebo stimulační kontrolou anti-FcεRI mAb. Vzorky byly vyšetřeny na dvou laboratorních pracovištích podle standardního protokolu. Byl použit plán studie 3 přístroje/sady x 2 operátoři x 1 den x 5 replikátů. Replikace odpovídá nezávislé stimulační reakci a úplnému postupu analýzy. Výsledky pro stimulační kontrolu anti-FcεRI mAb jsou shrnuty v tabulce 7.

Dárce	Průměr [%CD63]	n	V rámci běhu [%CV]	Mezi operátory [%CV]	Mezi šaržemi/přístroji [%CV]	Celkem [%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%

Tabulka 7

INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Citlivost testu Flow CAST® na léčiva, abnormální krevní stavy a přídavek vzorku K-EDTA byla hodnocena podle pokynů CLSI EP07-A2. Za interferenci se považovalo zkreslení výsledků přesahující 20 % pro stimulační kontrolu anti-FcεRI mAb a 20% CD63^{pos} (absolutně) pro stimulační kontrolu fMLP. U látek uvedených v tabulce 8 nebyly v uvedených koncentracích zjištěny žádné interference. Interference byla zjištěna u K-EDTA při dvojnásobné koncentraci K-EDTA ve venepunkční zkumavce u jednoho dárce.

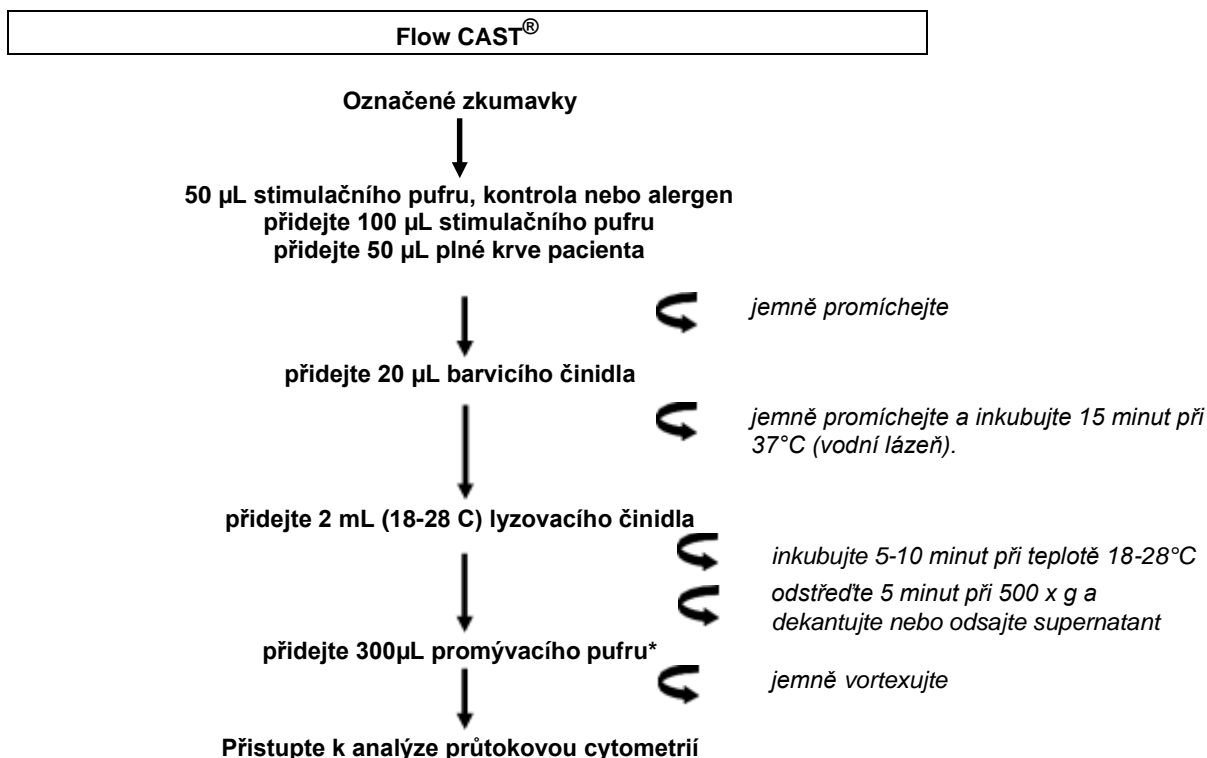
Aktivní složka	Testovaná koncentrace [µg/ml]
Fexofenadin hydrochlorid	1,6
Cetirizin dihydrochlorid	4,35
Hydroxyzin dihydrochlorid	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednison	1,2
N-acetyl-L-tryptofan	30
Triglyceridy (Intralipid)	20'000
Konjugovaný bilirubin	400
Nekonjugovaný bilirubin	400
Hemolýza	56'100

Tabulka 8

REFERENCE

1. Sainte-Laudy, J, et al. [Analýza membránové exprese lidského aktivačního markeru bazofilů CD63. Aplikace v alergologické diagnostice]. *Allerg Immunol (Paris)* 26, 211-4. (1994).
2. Sabbah, A a Sainte-Laudy, J. Průtoková cytometrie aplikovaná na analýzu aktivace lymfocytů a bazofilů. *ACI International* 8, 116-9 (1996).
3. Ugucconi, M., C. R. Mackay a kol. Vysoká exprese chemokinového receptoru CCR3 v lidských krevních bazofilech. Úloha při aktivaci eotaxinem, MCP-4 a dalšími chemokiny. *J Clin Invest* 100(5): 1137-43 (1997).
4. Sanz, ML, et al. Průtokový cytometrický test aktivace bazofilů pomocí detekce exprese CD63 u pacientů s bezprostředním typem reakce na betalaktamová antibiotika. *Clin Exp Allergy* 32, 277-86. (2002).
5. De Weck, AL a Sanz, ML. Průtokový cytometrický test buněčné stimulace alergenů (FAST/Flow-CAST): technické a klinické hodnocení nového diagnostického testu u alergie a pseudoalergie. *ACI International* 14, 204-215 (2002).
6. Eberlein, B. et al. Nový test aktivace bazofilů pomocí CD63 a CCR3 při alergii na antibiotika. *Clin. Exp. Allergy* 40, 411-418 (2010).
7. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Sledování aktivace lidských bazofilů pomocí monoklonální protilátky CD63 435. *J Allergy Clin Immunol.*;88(3 Pt 1):328-38 (1991).
8. Hoffmann HJ, Santos AF, et al. Klinická užitečnost testování aktivace bazofilů v diagnostice a monitorování alergických onemocnění. *Allergy*, 70:1393-1405 (2015).
9. Leysen, J. a kol. Test aktivace bazofilů v diagnostice okamžité přecitlivělosti na léky. *Expert Rev Clin Immunol* 7, 349-355 (2011).
10. Johansson, S. G. O., Lilja, G., Hallberg a kol. Klinické sledování omalizumabu při rutinní léčbě alergického astmatu monitorované pomocí CD-sens. *Immun. Inflamm. Dis.* 6, 382-391 (2018).

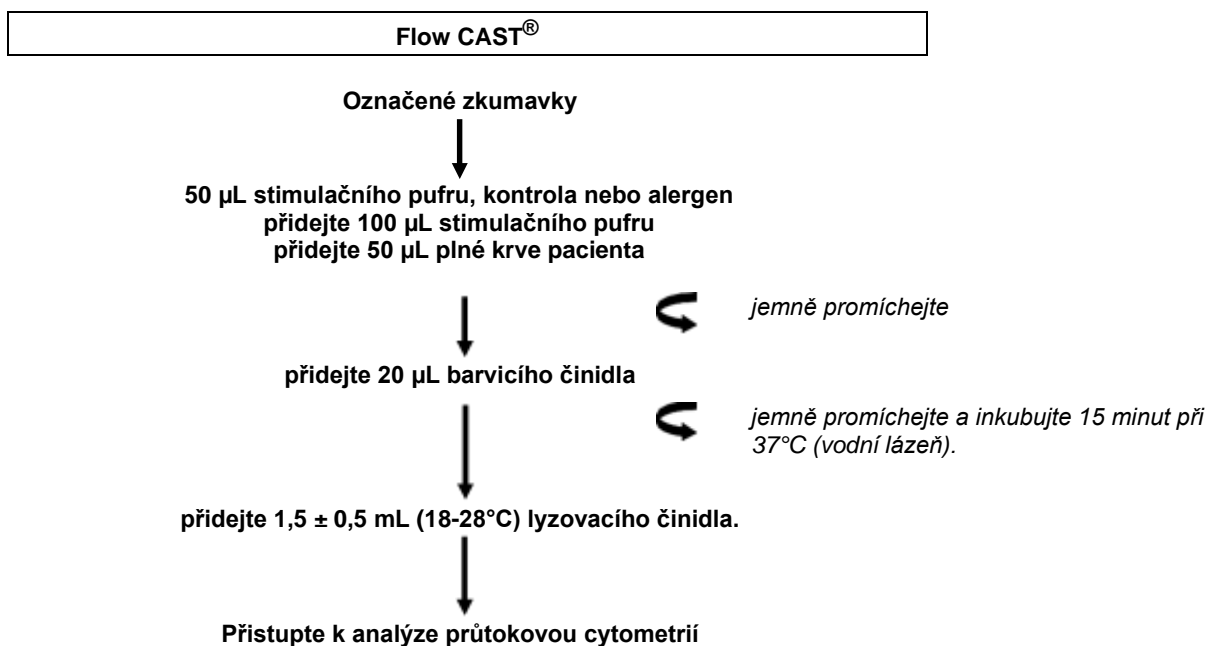
STANDARDNI PROTOKOL: LYSE A PROMYTI



DOBA AKVIZICE ~ 30 MIN / DOBA DO DOSAŽENÍ VÝSLEDKU: ~ 1 HODINA

* Poznámka: V závislosti na použitém průtokovém cytometru je třeba množství promývacího pufru přizpůsobit mrtvému objemu a hustotě buněk kompatibilní s přístrojem.

ALTERNATIVNÍ PROTOKOL: PROTOKOL LYSE-NO-WASH



DOBA AKVIZICE ~ 20 MIN/ DOBA DO DOSAŽENÍ VÝSLEDKU: ~ 1 HODINA

ZMĚNY

Datum	Verze	Změna
2023-06-21	A2	Přeformulování kapitoly <i>Analýza dat a klinický výkon</i> Zařazení čísla oznámeného subjektu do označení CE - postup posuzování shody podle nařízení IVDR 2017/746

HLÁŠENÍ INCIDENTŮ V ČLENSKÝCH STÁTECH EU

Pokud se v souvislosti s tímto prostředkem vyskytne jakákoli závažná událost, neprodleně ji nahlaste výrobci a příslušnému orgánu vašeho členského státu.

POŠKOZENÍ ZÁSILKY

Pokud jste tento výrobek obdrželi poškozený, oznamte to prosím svému distributorovi.

SYMBOLY

BÜHLMANN používá symboly a značky uvedené a popsané v normě ISO 15223-1. Kromě toho se používají následující symboly a značky:

Symbol	Vysvětlení
BUF STIM	Stimulační pufr
CONTROL STIM	Řízení stimulace
KONTROLA FMLP	Stimulační kontrola fMLP
REAG STAIN	Barvicí činidlo
REAG LYS	Lyzovací činidlo
BUF WASH	Promývací pufr

