



Flow CAST[®]

Basophilen-Aktivierungstest (BAT)
Durchflusszytometrie

Für den Gebrauch in der *In-vitro*-Diagnostik

FK-CCR 100 Tests

Freigabedatum: 2023-06-21
Version A2

 **Hersteller**

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

VERWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Flow CAST® ist ein *In-vitro*-Diagnosteset zur qualitativen Bewertung der basophilen Aktivierung nach Stimulation mit spezifischen Allergenen. Der Test analysiert aus K-EDTA-Vollblutproben von Patienten basophile Granulozyten durchflusszytometrisch, ob diese den Zelloberflächenmarker CD63 exprimieren. Das Flow CAST® Ergebnis ist ergänzend zur Diagnose von allergischen Erkrankungen vom Soforttyp in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden gedacht.

Nur für den Laborgebrauch.

TESTPRINZIP

Flow CAST® ist ein Basophilen-Aktivierungstest auf Basis der Durchflusszytometrie (Ref. 1, 2). Vollblut von Patienten wird mit spezifischen Allergenen, sowie mit Stimulationspuffer und Stimulationskontrollen stimuliert, um die basophile Degranulation des Patienten *ex vivo* zu bewerten. Die Probe wird mit zwei fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern angefärbt: einem für die Basophilenauswahl (Anti-CCR3-PE) und einem für die Bestimmung des Aktivierungsstatus der Basophilen (Anti-CD63-FITC) (Ref. 3-6). CD63 ist ein Transmembranprotein, das auf intrazellulären Vesikeln vorkommt und nur nach der basophilen Degranulation auf der Zelloberfläche auftritt (Ref. 7).

Die Erythrozyten aus der Patientenprobe werden mithilfe einer Lysereaktion entfernt. Je nach Protokoll werden die Zellen zentrifugiert, in Waschpuffer resuspendiert und für die spätere Analyse mittels Durchflusszytometrie fixiert oder direkt nach der Lyse analysiert. Basophile werden aus der Leukozytenpopulation als CCR3^{pos} /SSC^{low} gegatet und ihr Aktivierungsstatus der so markierten Basophilen wird durch ihre CD63-Expression (Aktivierungsmarker) bestimmt. Patienten, die keine IgE-vermittelten allergischen Reaktionen hervorrufen, so genannte Non-Responder, werden anhand der Ergebnisse der Positivkontrollen identifiziert. Das Ergebnis des Tests wird als das Verhältnis von CD63-positiven Basophilen zu allen Basophilen (%CD63-Aktivierung) angegeben.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien	Menge	Code	Rekonstitution
Stimulationspuffer mit Calcium, Heparin und IL-3	1 Fläschchen, lyophilisiert	B-CCR-STB	Mit 50 mL Wasser rekonstituieren ¹⁾
Stimulationskontrolle anti-FcεRI mAb	1 Fläschchen, lyophilisiert	B-CCR-STCON	Mit 1,5 mL B-CCR-STB rekonstituieren
Stimulationskontrolle fMLP ²⁾	1 Fläschchen, lyophilisiert	B-CCR-FMLP	Mit 1,5 mL B-CCR-STB rekonstituieren
Färbereagenz Mischung aus anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE mAb	1 Fläschchen 2,2 mL	B-CCR-SR	Gebrauchsfertig
Lyseereagenz ³⁾ 10x konzentriert	1 Fläschchen 25 mL	B-CCR-LYR	mit 225 mL deionisiertem Wasser verdünnen
Waschpuffer mit 0,1 % Formaldehyd	1 Fläschchen 100 mL	B-CCR-WB	Gebrauchsfertig

Tabelle 1

¹⁾ Für die erforderliche Wasserqualität siehe Kapitel Technische Vorsichtsmaßnahmen

²⁾ N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin

³⁾ Während der Lagerung bei 2-8 °C können sich Kristalle bilden, die vor dem Verdünnen bei 18-28 °C aufgelöst werden sollten

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Nicht geöffnete Reagenzien	
Bei 2-8 °C aufbewahren. Das Kit nicht über das Verfallsdatum (siehe Etikett) hinaus verwenden.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Stimulationspuffer	Bei -20 °C für 6 Monate aufbewahren. Aliquotieren, wenn eine wiederholte Verwendung zu erwarten ist.
Stimulationskontrolle STCON	
Stimulationskontrolle fMLP	
Lyseereagenz	Bis zu 6 Monate bei 2-8 °C aufbewahren.
Färbereagenz	
Waschpuffer	

Tabelle 2

ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

- K-EDTA Venenpunktionröhrchen
- Zentrifuge
- Pyrogenfreie Einwegröhrchen aus Polypropylen oder Polystyrol für die Durchflusszytometrie
- Reagenzglasgestelle für die Durchflusszytometrie zur Stimulation
- Vortex-Mischer
- (Optional) für Gewebekulturen geeignete Mikrotiterplatten zur Zellstimulation und Färbung für das Standardprotokoll
- (Optional) Deep-Well-Platten für Zellstimulation, Färbung, Lyse und Durchflusszytometrie-Erfassung für das Lyse-No-Wash-Protokoll
- Präzisionspipetten mit pyrogenfreien Einwegpipettenspitzen:
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - einstellbare Pipette (1-5 mL) und
 - Optional: einstellbarer Dispenser (10-50 µL)
- 50 mL-Zylinder für die Rekonstitution des Stimulationspuffers
- Steriles, hochreines und pyrogenfreies Wasser für die Rekonstitution des Stimulationspuffers (siehe Kapitel „Technische Vorsichtsmaßnahmen“)
- Wasserbad (empfohlen) oder auf 37 °C eingestellter Inkubator
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser sowie geeignete Laborglasware für die Verdünnung des Lyseereagenzes
- Deckel oder Parafilm zum Abdecken der Röhrchen während der Inkubationsschritte
- Flaschenaufsatz-Dispenser für Lyseereagenz und Waschpuffer
- Durchflusszytometer mit einer Laserquelle von 488 nm (blau) sowie Emissionsfiltern für den PE- und FITC-Nachweis
- Software für die durchflusszytometrische Analyse (siehe Kapitel Durchflusszytometrische Datenerfassung)

ALLERGENE MÜSSEN SEPARAT BESTELLT WERDEN

Allergene, die für Flow CAST® validiert sind, werden von BÜHLMANN separat angeboten. Bestellnummern für Allergene sowie Informationen zur Allergenzubereitung sind in den BÜHLMANN-Allergen-Broschüren auf der BÜHLMANN-Website zu finden:

www.buhlmannlabs.ch

Wichtiger Hinweis: Der Flow CAST® wurde nur in Kombination mit den bei der BÜHLMANN Laboratories AG erhältlichen CAST® Allergenen getestet. Es liegt in der alleinigen Verantwortung des Labors, die Verwendung von Allergenen zu validieren, die aus anderen Quellen stammen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Der Stimulationspuffer (B-CCR-STB) dieses Tests enthält Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten sie gemäss guter Laborpraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen.
- Die Reagenzien und Chemikalien müssen gemäss den nationalen Richtlinien und Bestimmungen für Biogefährdung als gefährlicher Abfall behandelt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

- Empfohlene Wasserqualität für den Flow CAST®: Die Verwendung von sterilem, ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser zur Rekonstitution des Stimulationspuffers (B-CCR-STB) ist für eine gute und reproduzierbare Basophilienstimulation unerlässlich. Folgende Wasserquellen können verwendet werden: Wasser von Zellkulturqualität, Wasser von Infusionsqualität oder deionisiertes, doppelt destilliertes Wasser, das in einem regelmässig gereinigten 10 kDa Ultrafilter ultragefiltert wird.
- Das Lysereagenz (B-CCR-LYR) kann mit deionisiertem, doppelt destilliertem Wasser oder der gleichen Wasserqualität, die für die Rekonstitution des Stimulationspuffers verwendet wird, rekonstituiert werden.
- Allergenkontamination während der Zellstimulation vermeiden: Aeroallergene im Labor können offene Blutproben und Zellsuspensionen kontaminieren und einen erhöhten Hintergrund verursachen. Blutproben- und Zellstimulationsröhrchen müssen sorgfältig mit Deckeln oder Parafilm abgedeckt werden. Hausstaubmilben, Pflanzenpollen, Latexhandschuhe oder potenziell latexhaltige Geräte sowie offene Fenster in dem Labor, in dem die Zellstimulation durchgeführt wird, vermeiden. Es wird empfohlen, die Schritte der Zellvorbereitung und -stimulation in einer Laminar-Flow-Haube durchzuführen.
- Ein Wasserbad ist im Vergleich zu einem Inkubator vorzuziehen, da es eine effizientere Wärmeübertragung ermöglicht. Bei Verwenden eines Inkubators ist sicherzustellen, dass die Temperatur 37 °C beträgt. Niedrigere oder höhere Temperaturen können die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Im Allgemeinen wird bei Arzneimittelallergenen eine geringe Aktivierung der Basophilen erwartet. Daher ist es entscheidend, dass während der Stimulation optimale

Bedingungen herrschen, einschliesslich der Temperatur. Für Arzneimittelallergene wird die Verwendung von Einzelröhrchen anstelle von Deep-Well-Platten empfohlen.

- Die Komponenten dürfen nach Ablauf des auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Kontamination der Reagenzien vermeiden.

Testdurchführung

- Das Lysereagenz auf Raumtemperatur (18–28 °C) bringen.
- Vor der Durchführung des Tests die Anweisungen sorgfältig durchlesen. Die Testleistung wird negativ beeinflusst, wenn Reagenzien unsachgemäss verdünnt, gehandhabt oder unter anderen Bedingungen als in dieser Bedienungsanleitung beschrieben gelagert werden.
- Proben, die unsachgemäss gehandhabt werden, können zu ungenauen Ergebnissen führen.
- Die Testansätze einer Sichtprüfung unterziehen, um die Wirksamkeit der Lyse zu beurteilen. Die Erythrozyten können unvollständig lysiert sein und auf einem Punktdiagramm an derselben Stelle liegen wie die Leukozyten.
- Eine verlängerte Lysezeit kann zu Zellverlusten führen. Sicherstellen, dass mindestens 300 Basophile für die Datenerfassung vorliegen. Wir empfehlen, dass die Erfassung von Proben, die mit dem Lyse-No-Wash-Protokoll verarbeitet wurden, innerhalb einer Stunde erfolgt.
- Die Durchflusszytometrie kann falsche Ergebnisse liefern, wenn das Zytometer falsch ausgerichtet ist, die Fluoreszenzemission nicht angemessen kompensiert wurde und die Gating-Regionen nicht sorgfältig positioniert wurden.

PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Es wird empfohlen, dass die Patienten mindestens 24 Stunden vor der Blutentnahme keine systemisch verabreichten antiallergischen Medikamente wie Kortikosteroide oder Chromoglycinsäure (DSCG) einnehmen.

Blut in **K-EDTA Venenpunktionsröhrchen** sammeln, indem die Röhrchen bis zur entsprechenden Volumenmarkierung befüllt werden. Die Röhrchen müssen mindestens bis zur Hälfte gefüllt sein. Ein (1) mL Vollblut reicht für etwa 18 Teströhrchen.

Blutproben dürfen nicht zentrifugiert oder eingefroren werden.

Vollblut

Bei 2–8 °C gelagerte Vollblutproben sollten innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme verarbeitet werden.

Zur Bestimmung von allergischen Erkrankungen auf Arzneimittel wird empfohlen, die Proben sofort und spätestens innerhalb von 24 Stunden nach der Probenahme zu verarbeiten.

Vollblutproben können auch bei Raumtemperatur aufbewahrt werden (Temperaturen bis 28 °C). Sie müssen jedoch innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme mit dem Standardprotokoll oder am Tag der Entnahme mit dem Lyse-No-Wash-Protokoll verarbeitet werden.

Verarbeitete Proben

Die nach dem Standardprotokoll verarbeiteten Zellen werden fixiert. Fixierte Zellen können 5 Tage lang lichtgeschützt bei 2–8 °C gelagert werden, um sie anschliessend mittels Durchflusszytometrie zu erfassen.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die antikoagulierte Blutprobe durch mehrmaliges Umdrehen des Venenpunktionröhrchens mischen.
2. Frische und pyrogenfreie Standardröhrchen aus Polypropylen oder Polystyrol für die Durchflusszytometrie vorbereiten.
3. Die Röhrchen für jeden Patienten z. B. wie folgt beschriften:

PB = Patientenhintergrund

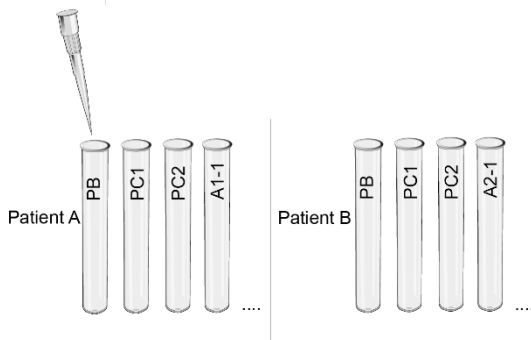
PC1 = Stimulationskontrolle mit anti-FcεRI Ab

PC2 = Stimulationskontrolle mit fMLP

A1-1 für Allergen 1 mit Verdünnung 1

A1-2 für Allergen 1 mit Verdünnung 2 usw.

50 µL stimulus
100 µL STB
50 µL blood
20 µL SR



Stimulation und Färben

4. 50 µL des entsprechenden Stimulans in jedes Röhrchen zugeben:
PB-Röhrchen: 50 µL **Stimulationspuffer** (Patientenhintergrund)
PC1-Röhrchen: 50 µL **Stimulationskontrolle** anti-FcεRI mAb
PC2-Röhrchen: 50 µL **Stimulationskontrolle** fMLP
Ax-y-Röhrchen: 50 µL des **Allergens**
5. 100 µL Stimulationspuffer (STB) in jedes Röhrchen zugeben.
6. 50 µL Vollblut des Patienten in jedes Röhrchen zugeben. Sicherstellen, dass die Wände und der obere Rand des Röhrchens frei von Blut sind.
7. Vorsichtig mischen.
8. 20 µL Färbereagenz (SR) in jedes Röhrchen zugeben.
9. Vorsichtig mischen, die Röhrchen zudecken und für 15 Minuten bei 37 °C in einem **Wasserbad** inkubieren.

Hinweis: Wird ein Inkubator anstelle eines Wasserbads verwendet, verlängert sich die Inkubationszeit auf 25 Minuten, da die Wärmeübertragung weniger effizient ist.

Lysieren

Hinweis: Das Lyseagenz muss auf Raumtemperatur (18–28 °C) gebracht werden.

Standardprotokoll: Lysieren und Waschen

10. Jedem Röhrchen 2 mL äquilibriertes (18–28 °C) Lyseagenz hinzufügen und vorsichtig mischen.
11. 5–10 Minuten bei 18–28 °C inkubieren.
12. Die Röhrchen 5 Minuten bei 500 x g zentrifugieren.
13. Den Überstand mit Löschpapier dekantieren.
14. Das Zellpellet mit 300 µL Waschpuffer resuspendieren (im Waschpuffer ist ein Fixiermittel enthalten).
15. Vorsichtig vortexen.

Hinweis: Die Menge des Waschpuffers kann an das verwendete Durchflusszytometer angepasst werden, je nachdem, welches Totvolumen und welche Zelldichte mit dem Gerät kompatibel sind.

Entweder 16a. Die Proben auf dem Durchflusszytometer erfassen.

Oder 16b. Wenn die Proben nicht sofort erfasst werden, 30 Minuten lang bei RT und vor Licht geschützt inkubieren (Fixierung) lassen. Die Proben bis zur Messung versiegelt und lichtgeschützt bei 2–8 °C aufbewahren. Fixierte Zellen können 5 Tage lang bei 2–8 °C gelagert werden, um sie anschliessend mittels Durchflusszytometrie zu erfassen. Die Proben vor der Messung vorsichtig mischen.

Hinweis: Gelagerte fixierte Proben können jederzeit ohne Vorbehandlung analysiert werden. Für die Lagerungszeiten bitte den Abschnitt "Probenentnahme und Lagerung" beachten. Nach längerer Lagerung kann eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität und eine geringere Basophilenausbeute ≥80% beobachtet werden.

Alternatives Protokoll: Lyse-No-Wash-Protokoll

Mit Hochleistungs-Durchflusszytometern der neuen Generation können lysierte, ungewaschene Proben analysiert werden. Das Verfahren muss an das verwendete Durchflusszytometer angepasst werden und kann eine Optimierung erfordern. Das nachstehende Protokoll basiert auf Daten, die mit einem Attune NxT-Durchflusszytometer (Thermo Fisher) gewonnen wurden.

10. Die Schritte 1 bis 9 des Testverfahrens (siehe oben) durchführen und dann mit Schritt 10 fortfahren. Jedem Röhrchen 1,5 ± 0,5 mL äquilibriertes (18–28 °C) Lyseagenz hinzufügen und vorsichtig mischen (das Volumen muss je nach Messgeschwindigkeit des verwendeten Durchflusszytometers optimiert werden).
11. Die Proben mit einem geeigneten Durchflusszytometer mit hohem Durchsatz und hoher Messgeschwindigkeit erfassen, um die Analysezeit minimal zu halten.

Hinweis: Die Proben sollten innerhalb von 24 Stunden nach Erhalt der Probe analysiert werden. Bitte den Abschnitt "Probenentnahme und Lagerung" beachten.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DATENERFASSUNG

Die durchflusszytometrische Erfassung kann mit jedem Durchflusszytometer durchgeführt werden, das mit einer 488-nm-Argon-Laserdiode (blau-grünes Anregungslicht) arbeitet.

Das Durchflusszytometer muss so ausgestattet sein, dass es Vorwärtsstreuung (FSC), (SSC) und die beiden Fluoreszenzfarbstoffkanäle FITC und PE erkennt.

Sicherstellen, dass das Durchflusszytometer richtig justiert ist und die Farbkompensation eingestellt ist.

Zur Erfassung und Charakterisierung von ruhenden und aktivierten Basophilen die folgenden Punktdiagramme erstellen:

1. Punktdiagramm 1 als Vorwärtsstreuung (FSC) vs. Seitwärtsstreuung (SSC) erstellen, um die gesamte Leukozytenpopulation zu erfassen, wie in Abbildung 1 dargestellt. Bei der Erfassung der Proben darauf achten, dass die Leukozytenpopulation im FSC/SSC-Punktdiagramm in drei diskrete Populationen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) aufgeteilt ist. Die Verstärkung der FSC- und SSC-Signale anpassen, um eine Verteilung wie in Abbildung 1. zu erhalten. Anweisungen hierzu sind den Produkthandbüchern der Durchflusszytometer zu entnehmen.
2. Punktdiagramm 2 als CCR3-PE vs. Seitwärtsstreuung (SSC) erstellen, wie in Abbildung 2 dargestellt. Ein Gate (z.B. Basophile) festlegen, das die gesamte Basophilenpopulation als CCR3^{pos} und SSC^{low} umfasst, wie in Abbildung 2 mit dem rechteckigen Gate gezeigt. Eosinophile, die ebenfalls CCR3^{pos} sind, müssen aufgrund der hohen SSC ausgeschlossen werden.
3. Punktdiagramm 3 als CD63-FITC vs CCR3-PE erstellen, das nur die Basophilen zeigt, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die nicht stimulierten, ruhenden Basophilen des Patienten Basalröhrchens (PB) verwenden, um ein Quadranten-Gate mit CD63-negativen basophilen Zellen im unteren rechten Quadranten zu erstellen (CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{low}), wie in Abbildung 3 gezeigt. Basophile, die durch die Stimulation mit Positivkontrollen und spezifischen Allergenen aktiviert werden, führen zu einer CD63-positiven Basophilenpopulation (CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}), die im oberen rechten Quadranten liegen, wie in Abbildung 4 anhand eines Beispiels für die Stimulation mit einer Positivkontrolle (STCON) dargestellt ist.

Das Ergebnis des Tests wird als das Verhältnis von CD63-positiven Basophilen zu allen Basophilen (%CD63-Aktivierung) angegeben, wie es im Quadranten-Gate des Punktdiagramm 3 für jedes der Stimulationsröhrchen ermittelt wurde.

basophile Zellen erfasst (z. B. bei einer Basopenie), können die Testergebnisse nicht ausgewertet werden.

DATENANALYSE

Die erfassten Daten werden mit einer geeigneten Durchflusszytometrie-Analysesoftware analysiert. Ähnliche Punktdiagramme und Gates wie bei der Erfassung festlegen.

Die Gates, mit denen die Basophilen in Punktdiagramm 2 identifiziert werden, können bei jeder der verschiedenen Stimulationen für dieselbe Patientenprobe unabhängig voneinander angepasst werden.

Für die korrekte Auswertung und Standardisierung der Ergebnisse wird mit der Patienten Basalstimulation (PB) eine Hintergrundeinstellung für jeden einzelnen Patienten festgelegt. Das auf dem Punktdiagramm 3 eingestellte Quadranten-Gate muss auf dem PB eingestellt werden. Zur Standardisierung der Analyse wird das Gating auf einen Wert zwischen 2 und 2,5 % aktivierter Basophilen in der PB-Probe eines jeden Patienten eingestellt (siehe Abbildung 3).

Dieses Gate muss auf alle nachfolgenden Stimulationen für dieselben Patienten (PC1, PC2 und alle gemessenen Allergene) angewendet werden, um den Prozentsatz der CD63-positiven Zellen bei jeder Stimulation zu berechnen (siehe Abbildung 4).

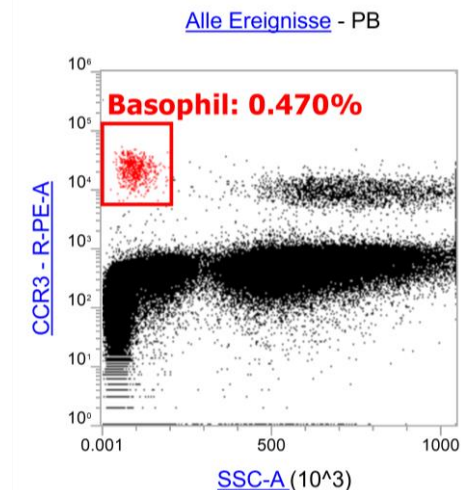


Abbildung 2: Auswahl der basophilen Zellen CCR3^{pos} / SSC^{low}

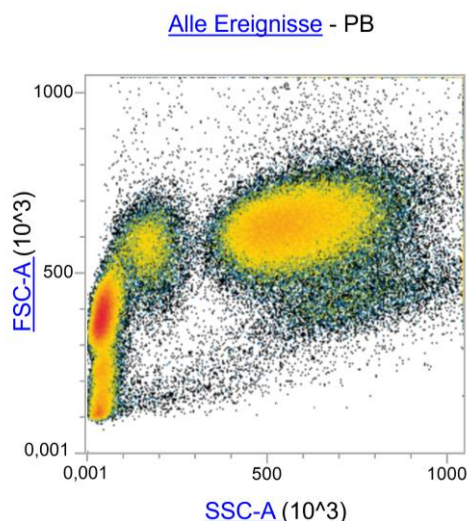
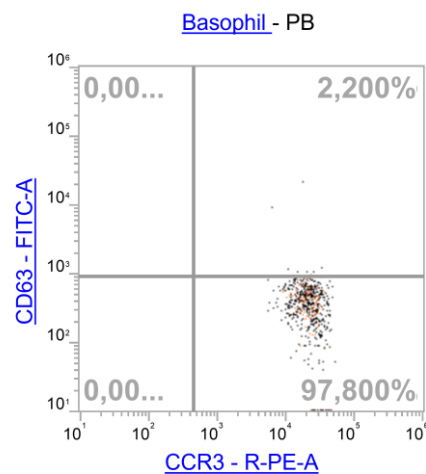


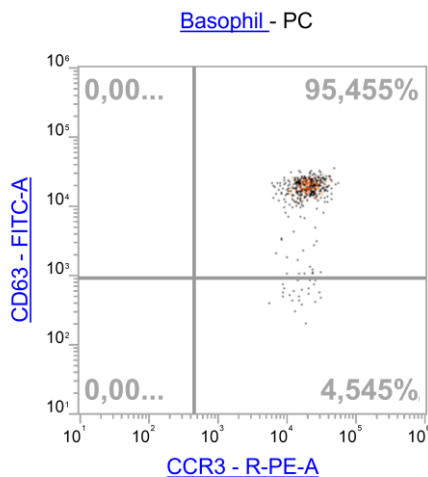
Abbildung 1: Drei diskrete Populationen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) in einem FSC/SSC-Punktdiagramm.

Möglichst 500 oder mehr basophile Zellen für jedes Stimulationsröhrchen erfassen (isoliert, wie in Punktdiagramm 2, Abbildung 2 unten, dargestellt). Werden weniger als 300



Gated Region	Anzahl (n =)	%
Summe	125864	100,0
Basophil	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{neg})	578	97,8

Abbildung 3: Patienten-Hintergrund (PB), nur mit STB



Gated Region	Anzahl (n =)	%
Summe	130926	100,0
Basophil	506	0,39
Q2 (CD63 _{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 _{neg})	23	4,5

Abbildung 4: Stimulationskontrolle (STCON)

QUALITÄTSKONTROLLE

Die folgenden Kriterien und Qualitätskontrollmassnahmen sollten für ein gültiges Ergebnis erfüllt sein:

Leukozyten-Populationen: In der Regel sollten drei verschiedene Leukozytenpopulationen - Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten - im FSC/SSC-Diagramm auftreten (siehe Abbildung 1). Ihr Auftreten kann als ein Kriterium für die Qualität der Blutprobe angesehen werden (Zeitraumen zwischen Probenentnahme und Testdurchführung, Lagerungsbedingungen). Die Testergebnisse können nicht ausgewertet werden, wenn weniger als 300 Basophile erfasst werden.

Stimulationskontrollen (Positivkontrollen) Anti-FcεRI mAb und fMLP: Der Anti-FcεRI mAb ahmt die durch das Allergen verursachte *in vivo* Überbrückung des Rezeptors nach. Das fMLP ist ein Tripeptid, dass die Basophilen auf nicht-immunologische Weise aktiviert.

- Wenn die Anti-FcεRI mAb-Kontrolle einen Wert von $\geq 10\%$ aktivierter Basophilen aufweist, können die Proben ausgewertet werden.
- Wenn nur die fMLP-Kontrolle ein Signal $\geq 10\%$ zeigt, der Anti-FcεRI mAb jedoch nicht, wurde der Test korrekt durchgeführt, die Testergebnisse können jedoch nicht bewertet werden. Der Patient gilt als IgE-Non-Responder.
- Wenn sowohl Anti-FcεRI mAb als auch fMLP Werte von $< 10\%$ für aktivierte Basophile aufweisen, ist ein technischer Fehler wahrscheinlich. Das Testergebnis ist als ungültig zu betrachten und der Test sollte wiederholt werden.

STANDARDISIERUNG

Flow CAST® misst die Population der Basophilen, die den Zelloberflächenmarker CD63 exprimieren, angeben in % der gesamten Basophilen. Es existieren keine international oder national anerkannten Referenzmaterialien oder Referenzmessverfahren für diesen Analyten.

Die Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge wird durch Titration der monoklonalen Anti-CD63-FITC- und Anti-CCR3-PE-Antikörperkonjugate gegen Kalibrierungsbeads

gewährleistet. Eine Schätzung der Schwankungen von Charge zu Charge finden Sie in den Ergebnissen der Reproduzierbarkeit im Abschnitt "Leistungsmerkmale".

EINSCHRÄNKUNGEN

- Flow CAST® Testergebnisse sollten in Kombination mit anderen klinischen- und Laborbefunden interpretiert werden.
- Um arzneimittelbedingte allergische Unverträglichkeiten festzustellen, sollte der BAT-Test innerhalb von 6 Monaten nach der allergischen Reaktion durchgeführt werden (Ref. 8).
- Sicherstellen, dass mindestens ein bis zwei Wochen nach einer allergischen Reaktion vergangen sind, bevor ein BAT-Test durchgeführt wird (Ref. 8).
- Negative Ergebnisse bei Arzneimittelallergenen sollten nicht zum Ausschluss einer Allergie herangezogen werden.
- 5 bis 10 % der Patientenbasophilen sprechen nicht auf IgE an. Bei diesen Patienten wird eine Hochregulierung der CD63-Expression und ein positives Ergebnis nicht beobachtet werden. Diese Non-Responder können mit Hilfe von Stimulationskontrollen identifiziert werden, die mit dem Flow CAST® Test geliefert werden (Ref. 9).
- Unzureichend gefüllte K-EDTA-Röhrchen (weniger als halb gefüllt) können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
- Bei Patienten, die mit Omalizumab (XOLAIR®) behandelt werden, ist eine Beeinflussung der Flow CAST® Testergebnisse zu erwarten (Ref. 10).
- Systemisch verabreichte antiallergische Medikamente wie Kortikosteroide und Chromoglycinsäure (DSCG) sollten mindestens 24 Stunden vor der Blutentnahme vermieden werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt folgende Flow CAST® Ergebniskategorien:

Ergebnis	Interpretation
< Toleranzgrenze (cut-off)	negativ
\geq Toleranzgrenze (cut-off) für eine oder beide Verdünnungen des Allergens.	positiv

Tabelle 3

TOLERANZGRENZE UND REFERENZINTERVALL

Es wurde eine technische Toleranzgrenze von 5 % aktivierten Basophilen festgelegt, wobei Ergebnisse $\geq 5\%$ CD63^{pos} auf eine basophile Aktivierung hinweisen.

Für jedes BÜHLMANN CAST® Allergen wird eine verbesserte Spezifität durch die Verwendung der allergenspezifischen Toleranzgrenzen erreicht, die in den BÜHLMANN Allergen Broschüren angegeben sind.

Referenzintervalle wurden gemäss CLSI-Dokument C28-A3 festgelegt. Einhundertzwanzig (120) Blutproben aus einem Blutspendezentrum wurden mit Stimulationspuffer oder Anti-FcεRI mAb stimuliert und nach Standard- und Lyse-No-Wash-Protokollen getestet. Die Tests wurden im Laufe von

26 Tagen von drei Mitarbeitern mit zwei Flow CAST® Reagenzchargen durchgeführt.

Kontrolle	Test Protokoll	Referenzintervall (90 % KI) [% CD63 ^{pos}]	
		2,5. Perzentil	97,5. Perzentil
Stimulationspuffer	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)

Tabelle 4

KLINISCHE LEISTUNG

Die klinische Leistung des Flow CAST® wurde im Rahmen einer systematischen wissenschaftlichen Literaturrecherche bewertet. Elf begutachtete Studien, die in einer systematischen Literaturrecherche identifiziert und einen Zeitraum bis November 2019 abdecken wurden herangezogen. Eine Studie zu Insektengiften, die in der ursprünglichen Suche nicht identifiziert wurde, und zwei Studien zu Erdnussallergenen, die nach 2019 veröffentlicht wurden, wurden in die Datenanalyse einbezogen. Die Studien untersuchten die Fähigkeit von Flow CAST® zwischen Personen mit allergischen Erkrankungen und nicht allergischen Personen zu unterscheiden. Allergische Erkrankungen wurden entweder durch a) die klinische Anamnese, b) eine orale Nahrungsmittelprobe (OFC) oder einen Provokationstest, c) die klinische Anamnese und Labortests (Skin Prick - SPT, sIgE) oder d) die klinische Anamnese und einen OTC-/Provokationstest bestätigt. Studien, die sIgE oder SPT als einzige klinische Referenz verwendeten, wurden ausgeschlossen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Allergengruppe	N Studien	Spezifität median (Bereich)	Allergische Personen (insgesamt)	Spezifität median (Bereich)	Kontrollpersonen (insgesamt)
Lebensmittel Inhalationsmittel	5	92 % (81–100 %)	311	93 % (80–100 %)	240
Insektengifte	2	87 % (73–89 %)	79	96 % (95–97 %)	39
Medikamente	7	55 % (0–68 %)	227	91 % (79–100 %)	167

Tabelle 5

LEISTUNGSMERKMALE

Laborinterne Präzision: ≤25% VK für die Aktivierung

Die Wiederholbarkeit (Intra-Test) und laborinterne Präzision wurden gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 und dem ISO-Standard 15197:2013 ermittelt. Vier Spenderblutproben wurden mit Stimulationspuffer oder der Stimulationskontrolle anti-FcεRI mAb stimuliert. Für das Standardverfahren wurde ein Studiendesign mit 2 Bedienern x 4 Tagen x 1 Lauf x 4 Replikaten verwendet. Für das Lyse-No-Wash-Verfahren wurde ein Studiendesign mit 2 Bedienern x 1 Tag x 4 Läufe x 4 Replikate verwendet. Ein Replikate entspricht einer unabhängigen Stimulationsreaktion und einem vollständigen Testverfahren. Die Ergebnisse für die Stimulationskontrolle anti-FcεRI mAb sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Testprotokoll	Spender	Mittelwert [%CD63]	n	Intra-Test [% VK]	Zwischen verschiedenen Tagen (A)	Zwischen verschiedenen Tests (B)	Gesamt [%VK]
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 %

Tabelle 6

Reproduzierbarkeit: ≤ 25 % VK für die Aktivierung

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Richtlinie EP05-A3 und dem ISO-Standard 15197:2013 ermittelt. Vier Spenderblutproben wurden mit Stimulationspuffer oder der Stimulationskontrolle anti-FcεRI mAb stimuliert. Die Proben wurden an zwei Laborstandorten nach dem Standardprotokoll untersucht. Es wurde ein Studiendesign mit 3 Instrumenten/Chargen x 2 Bedienern x 1 Tag x 5 Replikaten angewandt. Ein Replikate entspricht einer unabhängigen Stimulationsreaktion und einem vollständigen Testverfahren. Die Ergebnisse für die Stimulationskontrolle anti-FcεRI mAb sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Spender	Mittelwert [%CD63]	n	Intra-Test [% VK]	Zwischen verschiedenen Bedienern [%VK]	Zwischen verschiedenen Chargen/Instrumenten [%VK]	Gesamt [%VK]
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 %

Tabelle 7

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Die Anfälligkeit des Flow CAST® Tests gegenüber Arzneimitteln, anormalen Blutbedingungen und dem K-EDTA-Probenadditiv wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP07-A2 bewertet. Eine systematische Abweichung der Ergebnisse von mehr als 20 % für die Stimulationskontrolle anti-FcεRI mAb und 20 % CD63^{pos} (absolut) für die Stimulationskontrolle FMLP wurde als Interferenz betrachtet. Mit den in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen wurden bei den angegebenen Konzentrationen keine Interferenzen festgestellt. Bei einem Spender wurde eine Interferenz mit K-EDTA in der doppelten K-EDTA-Konzentration des Venenpunktionsröhrchens festgestellt.

Wirkstoff	Testkonzentrationkonzentration [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-tryptophan	30
Triglyzerid (Intralipid)	20000
Bilirubin, konjugiert	400
Bilirubin, unkonjugiert	400
Hämolyse	56100

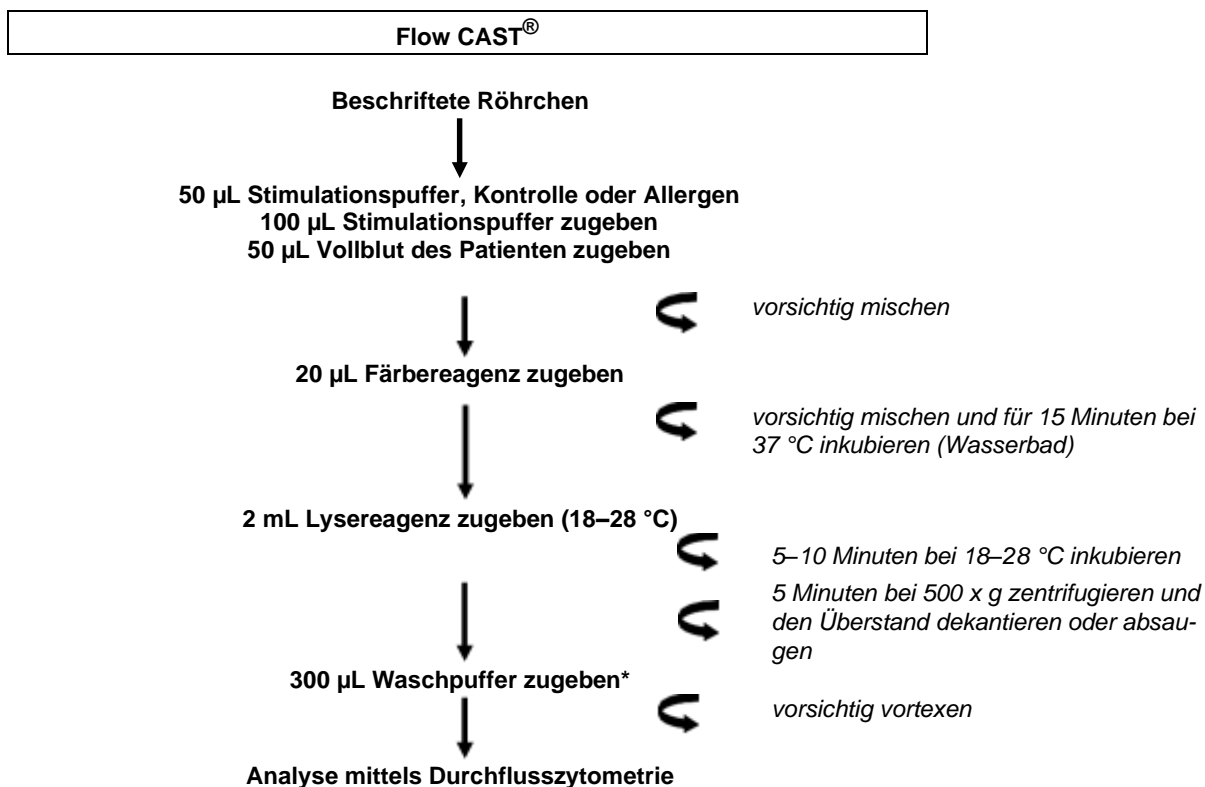
Tabelle 8

LITERATURHINWEISE

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).

KURZPROTOKOLLE

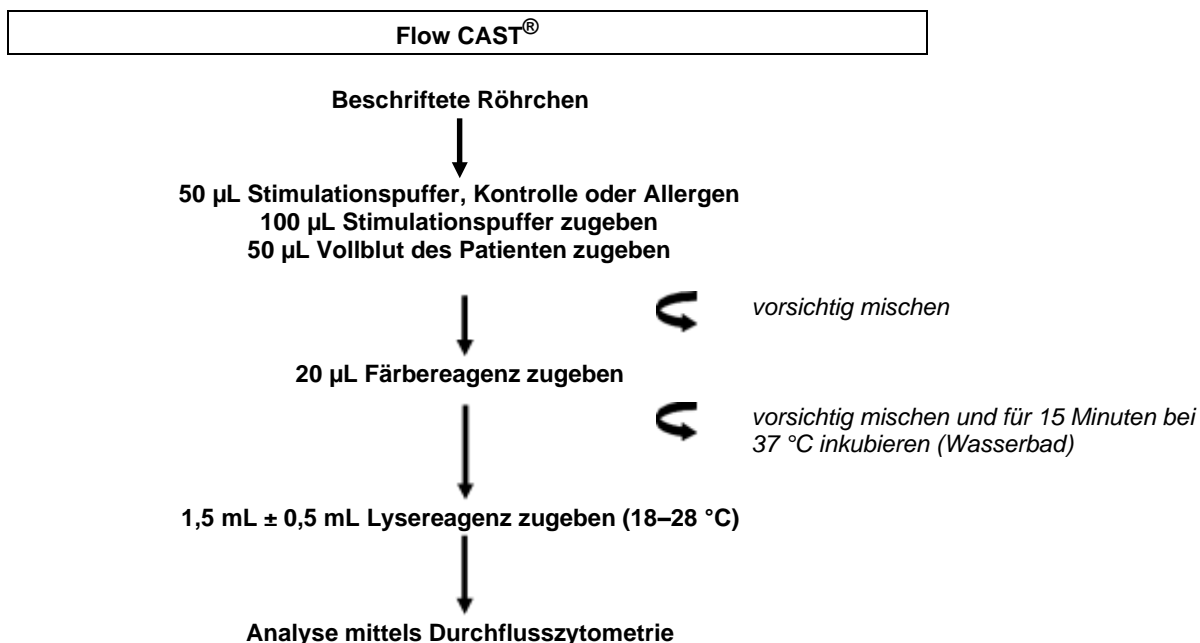
STANDARDPROTOKOLL: LYSIEREN UND WASCHEN



ZEIT BIS ZUR ERFASSUNG ~ 30 MIN/ ZEIT BIS ZUM ERGEBNIS: ~ 1 STUNDE

* Hinweis: Je nach verwendetem Durchflusszytometer sollte die Menge des Waschpuffers im Hinblick auf das Totvolumen und die Zelldichte an das Gerät angepasst werden.

ALTERNATIVES PROTOKOLL: LYSE-NO-WASH-PROTOKOLL



ZEIT BIS ZUR ERFASSUNG ~ 20 MIN/ ZEIT BIS ZUM ERGEBNIS: ~ 1 STUNDE

ÄNDERUNGSLOG

Datum	Version	Änderung
2023-06-21	A2	Umformulierung im Kapitel <i>Datenanalyse</i> und <i>Klinische Leistungen</i> Aufnahme der Nummer der benannten Stelle zur CE-Kennzeichnung – Konformitätsbewertungsverfahren gemäss IVDR 2017/746

MELDUNG VON ZWISCHENFÄLLEN IN EU-MITGLIEDSSTAATEN

Falls sich ein ernsthafter Zwischenfall in Zusammenhang mit diesem Produkt ereignet hat, melden Sie dies bitte umgehend dem Hersteller und der zuständigen Behörde Ihres Mitgliedsstaates.

SCHÄDEN BEIM VERSAND

Bitte informieren Sie Ihren Vertriebspartner, falls dieses Produkt beim Empfang beschädigt war.

SYMBOLLE

BÜHLMANN verwendet die in der ISO 15223-1 aufgeführten und beschriebenen Symbole und Zeichen. Darüber hinaus werden die folgenden Symbole und Zeichen verwendet:

Symbol	Erläuterung
BUF STIM	Stimulationspuffer
CONTROL STIM	Stimulationskontrolle
CONTROL FMLP	Stimulationskontrolle fMLP
REAG STAIN	Färbereagenz
REAG LYS	Lysereagenz
BUF WASH	Waschpuffer

