



Flow CAST®

Δοκιμή Ενεργοποίησης Βασεόφιλων Κυτταρομετρία Ροής

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

FK-CCR 100 tests

Ημερομηνία κυκλοφορίας: 2023-06-21
Έκδοση A2



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

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το BÜHLMANN Flow CAST® είναι μια *in vitro* διαγνωστική δοκιμή για την ποιοτική αξιολόγηση της ενεργοποίησης των βασεόφιλων κατά τη διέγερση με συγκεκριμένα αλλεργιογόνα. Η δοκιμή χρησιμοποιεί κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των βασεόφιλων που εκφράζουν τον δείκτη επιφανείας κυττάρων CD63 σε δείγματα ολικού αίματος K-EDTA ασθενών. Το Flow CAST® προορίζεται ως βοήθημα στη διάγνωση αλλεργικών διαταραχών άμεσου τύπου σε συνδυασμό με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.

Μόνο για εργαστηριακή χρήση.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το Flow CAST® είναι μια δοκιμή ενεργοποίησης βασεόφιλων που βασίζεται σε κυτταρομετρία ροής (αναφ. 1, 2). Ολικό αίμα από ασθενείς διεγείρεται με συγκεκριμένα αλλεργιογόνα, καθώς και με ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης και μάρτυρες διέγερσης, για να αξιολογηθεί η *ex vivo* αποκοκκίωση των βασεόφιλων του ασθενούς. Το δείγμα βάφεται χρησιμοποιώντας δύο μονοκλωνικά αντισώματα επισημασμένα με φθορισμό: ένα για την επιλογή βασεόφιλων (anti-CCR3-PE) και ένα για τον προσδιορισμό της κατάστασης ενεργοποίησης των βασεόφιλων (anti-CD63-FITC) (αναφ. 3-6). Το CD63 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που υπάρχει σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και εμφανίζεται μόνο στην κυτταρική επιφάνεια μετά την αποκοκκίωση των βασεόφιλων (αναφ. 7).

Τα ερυθροκύτταρα από το δείγμα του ασθενούς αφαιρούνται με αντίδραση λύσης. Ανάλογα με το πρωτόκολλο, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και σταθεροποιούνται για μεταγενέστερη ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ή αναλύονται αμέσως μετά τη λύση. Τα βασεόφιλα περικλείονται από τον πληθυσμό των λευκοκυττάρων ως CCR3^{pos}/SSC^{low}. Η κατάσταση ενεργοποίησης των gated βασεόφιλων καθορίζεται από την έκφρασή του CD63 (δείκτης ενεργοποίησης). Οι ασθενείς που δεν εμφανίζουν αλλεργικές αντιδράσεις με τη μεσολάβηση IgE, που ονομάζονται μη ανταποκρινόμενοι, προσδιορίζονται με βάση τα αποτελέσματα των θετικών μαρτύρων. Η ανάγνωση της δοκιμασίας υποδεικνύεται ως η αναλογία των CD63 θετικών βασεόφιλων έναντι όλων των βασεόφιλων (% ενεργοποίηση CD63).

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Αντιδραστήρια	Ποσότητα	Κωδικός	Σχόλια
Ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης που περιέχει ασβέστιο, ηπαρίνη και IL-3	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	B-CCR-STB	Ανασύσταση με 50 mL νερό ¹⁾
Μάρτυρας Διέγερσης anti-FcεRI mAb	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	B-CCR-STCON	Ανασύσταση με 1,5 mL από B-CCR-STB
Μάρτυρας Διέγερσης fMLP ²⁾	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	B-CCR-FMLP	Ανασύσταση με 1,5 mL από B-CCR-STB
Αντιδραστήριο χρώσης	1 φιαλίδιο 2,2 mL	B-CCR-SR	Έτοιμο προς χρήση

Μίγμα από anti-CD63-FITC και anti-CCR3-PE mAb			
Αντιδραστήριο λύσης ³⁾ 10x συμπυκνωμένο	1 φιαλίδιο 25 mL	B-CCR-LYR	Αραίωση με 225 mL απιονισμένου νερού
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης με 0,1% φορμαλδεΰδη	1 φιαλίδιο 100 mL	B-CCR-WB	Έτοιμο προς χρήση

Πίνακας 1

¹⁾ Για την απαιτούμενη ποιότητα νερού, ανατρέξτε στο κεφάλαιο Τεχνικές Προφυλάξεις

²⁾ N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

³⁾ Μπορεί να σχηματιστούν κρύσταλλοι κατά την αποθήκευση στους 2-8 °C και θα πρέπει να διαλυθούν στους 18-28 °C πριν από την αραίωση

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Μη ανοιγμένα αντιδραστήρια	
Φυλάσσονται στους 2-8 °C. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια πέρα από την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.	
Ανοιγμένα αντιδραστήρια και ανασυσταμένα αντιδραστήρια	
Ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης	Σταθερό στους -20 °C για 6 μήνες. Διαιρέστε σε ποσότητες εάν αναμένεται επαναλαμβανόμενη χρήση.
Μάρτυρας Διέγερσης	
Μάρτυρας Διέγερσης fMLP	
Αντιδραστήριο λύσης	Σταθερά στους 2-8 °C για 6 μήνες.
Αντιδραστήριο χρώσης	
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης	

Πίνακας 2

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Σωλήνες φλεβοκέντησης K-EDTA
- Φυγόκεντρος
- Δοκιμαστικά σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής από πολυπροπυλένιο ή πολυστυρένιο μιας χρήσης, χωρίς πυρετογόνα
- Ράφια δοκιμαστικών σωληναρίων κυτταρομετρίας ροής για τη διέγερση
- Μίκτης Vortex
- (Προαιρετικά) τρυβλία μικροπιλοδότησης καλλιέργειας ιστών για διέγερση και χρώση κυττάρων για το τυπικό πρωτόκολλο
- (Προαιρετικά) πλάκες βαθιάς κοιλότητας για διέγερση κυττάρων, χρώση, λύση και λήψη κυτταρομετρίας ροής για το πρωτόκολλο λύση-όχι πλύση
- Πιπέτες ακριβείας με τιπς μιας χρήσης, χωρίς πυρετογόνα:
 - 10-100 μL, 100-1000 μL
 - Ρυθμιζόμενη πιπέτα 1-5 mL και
 - Προαιρετικά: Ρυθμιζόμενος διανομέας 10-50 μL
- Κύλινδρος 50 mL για ανασύσταση ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης
- Αποστειρωμένο, υπερκαθαρό και απυρετογόνο νερό για την ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης (ανατρέξτε στο κεφάλαιο Τεχνικές Προφυλάξεις)
- Λουτρό νερού (συνιστάται) ή επωαστικός θάλαμος στους 37 °C

- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό καθώς και κατάλληλα εργαστηριακά γυάλινα σκεύη για την αραίωση του αντιδραστήριου λύσης
- Καπάκια ή παραφίλμ για την κάλυψη των σωληναρίων κατά τα στάδια επώασης
- Διανομείς άνω μέρους φιάλης για το αντιδραστήριο λύσης και το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
- Κυτταρόμετρο ροής εξοπλισμένο με πηγή λέιζερ 488 nm (μπλε), καθώς και φίλτρα εκπομπής για ανίχνευση PE και FITC
- Λογισμικό ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής (ανατρέξτε στο κεφάλαιο Απόκτηση Κυτταρομετρικών Δεδομένων Ροής)
- Αποφύγετε τη μόλυνση από αλλεργιογόνα κατά τη διέγερση των κυττάρων: Τα αεροαλλεργιογόνα στο εργαστήριο μπορεί να μολύνουν ανοιχτά δείγματα αίματος και κυτταρικά εναιωρήματα, προκαλώντας αυξημένο υπόβαθρο. Τα δείγματα αίματος και τα σωληνάκια διέγερσης των κυττάρων πρέπει να καλύπτονται προσεκτικά με καπάκια ή παραφίλμ. Αποφύγετε ακάρεα οικιακής σκόνης, φυτά επικονίασης, γάντια λατέξ ή εξοπλισμό που ενδεχομένως περιέχει λατέξ καθώς και ανοιχτά παράθυρα στο εργαστήριο όπου πραγματοποιείται η κυτταρική διέγερση. Συνιστάται η εκτέλεση των βημάτων προετοιμασίας και διέγερσης των κυττάρων να γίνεται σε καμπίνα στρωτής ροής.

ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΠΑΡΑΓΓΕΛΘΟΥΝ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ

Τα αλλεργιογόνα που έχουν επικυρωθεί για το Flow CAST® προσφέρονται ξεχωριστά από την BÜHLMANN. Για κωδικούς παραγγελίας αλλεργιογόνων, καθώς και πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία των αλλεργιογόνων, ανατρέξτε στα Εγχειρίδια Αλλεργιογόνων BÜHLMANN στην ιστοσελίδα της BÜHLMANN: www.buhlmannlabs.ch

Σημαντικό: Το Flow CAST® δοκιμάστηκε μόνο σε συνδυασμό με τα CAST® Allergens που διατίθενται από την BÜHLMANN Laboratories AG. Είναι αποκλειστική ευθύνη του εργαστηρίου να επικυρώσει τη χρήση αλλεργιογόνων που λαμβάνονται από άλλες πηγές.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Μέτρα ασφαλείας

- Το ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης (B-CCR-STB) αυτής της δοκιμής περιέχει συστατικά ανθρώπινης προέλευσης. Αν και δοκιμάστηκαν και βρέθηκαν αρνητικά για αντιγόνο επιφανείας HBV, HCV και αντισώματα HIV1/2, τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αντιμετωπίζονται σαν να είναι ικανά να μεταδώσουν λοιμώξεις και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις Ορθές Εργαστηριακές Πρακτικές (GLP) με τις κατάλληλες προφυλάξεις.
- Αποφύγετε την επαφή των αντιδραστηρίων με το δέρμα, τα μάτια ή τους βλεννογόνους. Εάν συμβεί επαφή, πλύνετε αμέσως με μεγάλη ποσότητα νερού.
- Τα αντιδραστήρια και τα χημικά πρέπει να αντιμετωπίζονται ως επικίνδυνα απόβλητα σύμφωνα με τις εθνικές κατευθυντήριες γραμμές ή κανονισμούς για την ασφάλεια των βιολογικών κινδύνων.

Τεχνικές προφυλάξεις

- Συνιστώμενη ποιότητα νερού για το Flow CAST®: Η χρήση αποστειρωμένου, υπερκαθαρού και απυρετογόνου νερού για την ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης (B-CCR-STB) είναι απαραίτητη για την καλή και αναπαραγώγιμη διέγερση των βασεόφιλων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ακόλουθες πηγές νερού: νερό ποιότητας κυτταροκαλλιέργειας, νερό ποιότητας έγχυσης ή απιονισμένο, διπλά απεσταγμένο νερό που υπερφιλτράρεται περιοδικά από απολυμασμένο υπερφίλτρο 10 kDa.
- Το αντιδραστήριο λύσης (B-CCR-LYR) μπορεί να ανασυσταθεί με απιονισμένο, διπλά απεσταγμένο νερό ή με την ίδια ποιότητα νερού που χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης.

- Συνιστάται υδατόλουτρο σε σύγκριση με επωαστικό θάλαμο, λόγω της πιο αποτελεσματικής μεταφοράς θερμότητας. Εάν χρησιμοποιείτε επωαστικό θάλαμο, βεβαιωθείτε ότι η θερμοκρασία είναι 37 °C. Οι χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
- Γενικά αναμένεται χαμηλό επίπεδο ενεργοποίησης των βασεόφιλων για τα φαρμακευτικά αλλεργιογόνα. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να επιτυγχάνονται οι βέλτιστες συνθήκες κατά τη διέγερση, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας. Συνιστάται η χρήση απλών σωληναρίων έναντι πλακών με βαθιά φρεάτια για φαρμακευτικά αλλεργιογόνα.
- Τα συστατικά δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.
- Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια διαφορετικών παρτίδων.
- Αποφύγετε τη μόλυνση των αντιδραστηρίων.

Διαδικασία δοκιμής

- Εξισορροπήστε το αντιδραστήριο λύσης σε θερμοκρασία δωματίου (18-28 °C).
- Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής. Η απόδοση των δοκιμών θα επηρεαστεί αρνητικά, εάν τα αντιδραστήρια αραιωθούν, χειριστούν ή φυλαχθούν λανθασμένα υπό συνθήκες διαφορετικές από αυτές που αναφέρονται σε αυτήν την οδηγία χρήσης.
- Τα δείγματα που δεν χειρίζονται σωστά μπορεί να προκαλέσουν ανακριβή αποτελέσματα.
- Επαληθεύστε τα σκευάσματα με το μάτι για να αξιολογήσετε την αποτελεσματικότητα της λύσης. Τα ερυθροκύτταρα μπορεί να είναι ατελώς λυμένα και να εμφανίζονται σε διάγραμμα διάθλασης φωτός κουκκίδων στην ίδια θέση με τα λευκοκύτταρα.
- Ο παρατεταμένος χρόνος λύσης μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια κυττάρων. Βεβαιωθείτε ότι έχετε τουλάχιστον 300 βασεόφιλα για απόκτηση δεδομένων. Συνιστάται η λήψη δειγμάτων που έχουν υποστεί επεξεργασία με το πρωτόκολλο λύση-όχι πλύση να πραγματοποιείται εντός μίας ώρας.
- Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να παράξει ψευδή αποτελέσματα, εάν: το κυτταρόμετρο δεν είναι ευθυγραμμισμένο, η εκπομπή φθορισμού δεν έχει αντισταθμιστεί κατάλληλα, οι περιοχές gating δεν έχουν τοποθετηθεί προσεκτικά.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συνιστάται στους ασθενείς να αποφεύγουν τα συστηματικά χορηγούμενα αντιαλλεργικά φάρμακα όπως τα

κορτικοστεροειδή και το χρωμογλυκικό οξύ (DSCG) για τουλάχιστον 24 ώρες πριν από την αιμοληψία.

Συλλέξτε το αίμα σε σωληνάρια φλεβοκέντησης K-EDTA, γεμίζοντας τα σωληνάρια μέχρι την ειδική ένδειξη όγκου. Τα σωληνάρια πρέπει να γεμίσουν τουλάχιστον μέχρι τη μέση. Ένα (1) mL ολικού αίματος επαρκεί για περίπου 18 δοκιμαστικά σωληνάρια.

Μην φυγοκεντρείτε ή καταψύχετε δείγματα αίματος.

Ολικό αίμα

Τα δείγματα ολικού αίματος που αποθηκεύονται στους 2-8 °C θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία εντός 48 ωρών από τη συλλογή.

Για τον προσδιορισμό των αλλεργικών διαταραχών στα φάρμακα, συνιστάται η επεξεργασία των δειγμάτων άμεσα και το αργότερο 24 ώρες από τη συλλογή του δείγματος.

Τα δείγματα ολικού αίματος μπορούν επίσης να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (θερμοκρασίες έως 28 °C). Ωστόσο, πρέπει να υποβληθούν σε επεξεργασία εντός 24 ωρών από τη συλλογή χρησιμοποιώντας το τυπικό πρωτόκολλο ή την ημέρα της συλλογής χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο λύση-όχι πλύση.

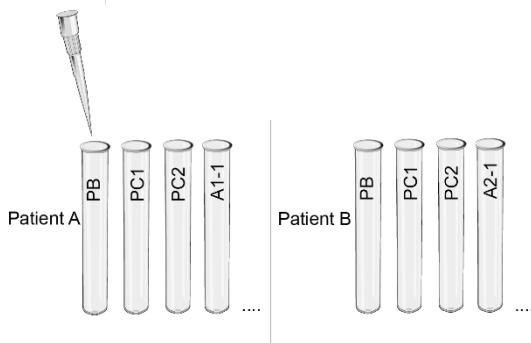
Επεξεργασμένα δείγματα

Τα κύτταρα που υποβάλλονται σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το τυπικό πρωτόκολλο είναι σταθεροποιημένα. Τα σταθεροποιημένα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν στους 2-8 °C για 5 ημέρες προστατευμένα από το φως για μετέπειτα λήψη με κυτταρομετρία ροής.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

1. Αναμείξτε το δείγμα αντιπηκτικού αίματος αναστρέφοντας το σωληνάριο φλεβοκέντησης πολλές φορές.
2. Προετοιμάστε καινούργια και ελεύθερα από πυρετογόνα σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής από πολυπροπυλένιο ή πολυστυρένιο.
3. Για κάθε ασθενή, επισημάνετε τα σωληνάρια π.χ. τα ακόλουθα:
PB = υπόβαθρο ασθενή
PC1 = μάρτυρας διέγερσης με anti-FcεRI Ab
PC2 = μάρτυρας διέγερσης με fMLP
A1-1 για αλλεργιογόνο 1 με αραιώση 1
A1-2 για αλλεργιογόνο 1 με αραιώση 2 κλπ.

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



Διέγερση και χρώση

4. Προσθέστε 50 μL του αντίστοιχου διεγέρτη σε κάθε σωληνάριο:
PB σωληνάριο: 50 μL του **ρυθμιστικού διαλύματος**

διέγερσης (υπόβαθρο ασθενούς)

PC1 σωληνάριο: 50 μL του **μάρτυρα διέγερσης anti-FcεRI mAb**

PC2 σωληνάριο: 50 μL του **μάρτυρα διέγερσης fMLP**

Ax-y σωληνάριο: 50 μL του **αλλεργιογόνου**

5. Προσθέστε 100 μL του **ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης (STB)** σε κάθε σωληνάριο.
6. Προσθέστε 50 μL ολικού αίματος του ασθενούς σε κάθε σωληνάριο. Βεβαιωθείτε ότι η πλευρά και το πάνω μέρος του σωληνάρια είναι απαλλαγμένα από αίμα.
7. Αναμείξτε απαλά.
8. Προσθέστε 20 μL του αντιδραστήριου χρώσης (SR) σε κάθε σωληνάριο.
9. Αναμείξτε απαλά, καλύψτε τα σωληνάρια και επωάστε για 15 λεπτά στους 37 °C σε **υδατόλουτρο**.

Σημείωση: Εάν χρησιμοποιείτε επωαστικό θάλαμο, αντί για υδατόλουτρο, ο χρόνος επώασης παρατείνεται στα 25 λεπτά λόγω της λιγότερο αποτελεσματικής μεταφοράς θερμότητας.

Λύση

Σημείωση: Το αντιδραστήριο λύσης πρέπει να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (18-28 °C).

Τυπικό πρωτόκολλο: Λύση και πλύση

10. Προσθέστε 2 mL εξισορροπημένου (18-28 °C) αντιδραστήριου λύσης σε κάθε σωληνάριο, αναμείξτε απαλά.
 11. Επωάστε για 5-10 λεπτά στους 18-28 °C.
 12. Φυγοκεντρήστε τα σωληνάρια για 5 λεπτά στους 500 x g.
 13. Απορρίψτε το υπερκείμενο χρησιμοποιώντας στυπόχαρτο.
 14. Ενωρήστε ξανά το κυτταρικό ίζημα με 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (ένα σταθεροποιητικό περιλαμβάνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης).
- Σημείωση: Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης μπορεί να προσαρμοστεί στα ειδικά όργανα κυτταρομέτρου ροής που χρησιμοποιούνται, σύμφωνα με τον dead όγκο και την πυκνότητα των κυττάρων που είναι συμβατή με τη συσκευή.
15. Αναδεύστε απαλά στο vortex.

Είτε 16a. συλλέξτε τα δείγματα στο κυτταρόμετρο ροής.

Ή 16b. εάν δεν ληφθεί αμέσως, αφήστε τα δείγματα να επωαστούν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως (σταθεροποίηση). Φυλάξτε τα δείγματα σφραγισμένα και προστατευμένα από το φως στους 2-8 °C μέχρι τη μέτρηση. Τα σταθεροποιημένα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν στους 2-8 °C για 5 ημέρες για επακόλουθη συλλογή με κυτταρομετρία ροής. Αναδεύστε απαλά τα σωληνάρια δείγματος πριν από τη συλλογή.

Σημείωση: Τα αποθηκευμένα σταθεροποιημένα δείγματα μπορούν να ληφθούν χωρίς καμία προεπεξεργασία ανά πάσα στιγμή. Ανατρέξτε στην ενότητα «Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων» για τους χρόνους αποθήκευσης. Μπορεί να παρατηρηθεί μια ελαφρά μείωση της έντασης φθορισμού και χαμηλότερη ανάκτηση βασεόφιλων $\geq 80\%$ μετά από μακρύτερη αποθήκευση.

Εναλλακτικό πρωτόκολλο: Λύση-όχι πλύση πρωτόκολλο

Τα νέας γενιάς κυτταρόμετρα ροής υψηλής απόδοσης

μπορούν να αναλύσουν λυμένα, δείγματα χωρίς πλύση. Αυτή η διαδικασία πρέπει να προσαρμοστεί στα όργανα του κυτταρομέτρου ροής που χρησιμοποιούνται και μπορεί να απαιτεί βελτιστοποίηση. Το παρακάτω πρωτόκολλο βασίζεται σε δεδομένα που αποκτήθηκαν με ένα κυτταρομέτρο ροής Attune NxT (Thermo Fisher).

10. Εκτελέστε τα βήματα της διαδικασίας ανάλυσης 1 έως 9 (παραπάνω) και μετά συνεχίστε στο βήμα 10 εδώ. Προσθέστε $1,5 \pm 0,5$ mL ισορροπημένου αντιδραστηρίου λύσης ($18-28$ °C) σε κάθε σωληνάριο, ανακατέψτε απαλά (ο όγκος πρέπει να βελτιστοποιηθεί ανάλογα με τις δυνατότητες ταχύτητας λήψης του χρησιμοποιούμενου κυτταρομέτρου ροής).
11. Συλλέξτε τα δείγματα χρησιμοποιώντας μια κατάλληλη συσκευή κυτταρομέτρου ροής υψηλής απόδοσης με υψηλή ταχύτητα λήψης για να διατηρήσετε τον ελάχιστο χρόνο ανάλυσης.

Σημείωση: Τα δείγματα πρέπει να αναλύονται εντός 24 ωρών από τη λήψη του δείγματος. Παρακαλούμε ανατρέξτε στην ενότητα «Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων».

ΛΗΨΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΡΟΗΣ

Η λήψη κυτταρομετρίας ροής μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιοδήποτε κυτταρομέτρο ροής που λειτουργεί με δίοδο λέιζερ αργού 488 nm (μπλε-πράσινο φως διέγερσης).

Το κυτταρομέτρο ροής πρέπει να είναι εξοπλισμένο για την ανίχνευση της εμπρόσθιας διασποράς (FSC), της πλευρικής διασποράς (SSC) και των δύο καναλιών φθοριοχρωμάτων FITC και PE.

Βεβαιωθείτε ότι το κυτταρομέτρο ροής είναι σωστά ευθυγραμμισμένο και ότι έχει ρυθμιστεί η αντιστάθμιση χρώσης.

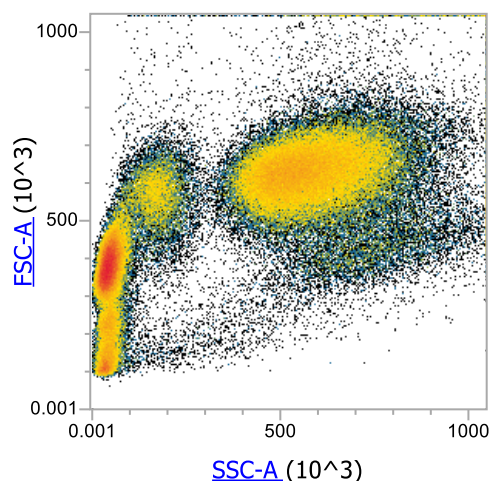
Για την κατάλληλη λήψη και χαρακτηρισμό των ηρεμούντων και ενεργοποιημένων βασεόφιλων δημιουργήστε το ακόλουθο διάγραμμα σημείων:

1. Δημιουργήστε διάγραμμα σημείων 1, σαν Forward Scatter vs Side Scatter για την απόκτηση ολόκληρου του πληθυσμού λευκοκυττάρων όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Κατά τη λήψη των δειγμάτων, βεβαιωθείτε ότι ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων διαχωρίζεται σε τρεις διακριτούς πληθυσμούς (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα) στο διάγραμμα σημείων FSC/SSC. Ρυθμίστε την ενίσχυση (κέρδος) των σημάτων FSC και SSC για να αποκτήσετε μια κατανομή όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Ανατρέξτε στα εγχειρίδια προϊόντος του κυτταρομέτρου ροής για οδηγίες.
2. Δημιουργήστε το διάγραμμα σημείων 2, ως CCR3-PE vs Side Scatter όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Ορίστε ένα gate (π.χ. βασεόφιλα) που περιλαμβάνει ολόκληρο τον πληθυσμό των βασεόφιλων ως $CCR3^{pos}$ και SSC^{low} όπως φαίνεται με το ορθογώνιο gate στο Σχήμα 2. Τα ηωσινόφιλα, που είναι επίσης $CCR3^{pos}$, πρέπει να εξαιρεθούν με βάση το υψηλό SSC.
3. Δημιουργήστε το διάγραμμα σημείων 3, ως CD63-FITC vs CCR3-PE, που δείχνει μόνο τα gated βασεόφιλα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Χρησιμοποιήστε τα μη διεγερμένα, σε ηρεμία, βασεόφιλα του σωληναρίου υποβάθρου ασθενούς (PB) για να ορίσετε ένα gate τεταρτημορίου που περιλαμβάνει κύτταρα αρνητικών βασεόφιλων CD63 στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο ($CD63^{neg}CCR3^{pos}/SSC^{low}$) όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Βασεόφιλα που ενεργοποιούνται από τη διέγερση θετικών μαρτύρων και ειδικών αλλεργιογόνων θα έχουν

ως αποτέλεσμα τον πληθυσμό $CD63$ θετικών βασεόφιλων ($CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}$) που αναγνωρίζονται στο άνω δεξιό τεταρτημόριο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4 με ένα παράδειγμα διέγερσης θετικού μάρτυρα (STCON).

Η ανάγνωση της δοκιμασίας υποδεικνύεται ως η αναλογία των $CD63$ θετικών βασεόφιλων έναντι όλων των βασεόφιλων (% ενεργοποίηση $CD63$) όπως προσδιορίζεται στο gate τεταρτημορίου του διαγράμματος σημείων 3 για οποιαδήποτε από τα σωληνάκια διέγερσης.

All Events - PB



Εικόνα 1: Τρεις διακριτοί πληθυσμοί (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα) σε ένα FSC/SSC διάγραμμα σημείων.

Αποκτήστε 500 ή περισσότερα βασεόφιλα κύτταρα για οποιαδήποτε σωληνάκια διέγερσης (gated όπως φαίνεται στο διάγραμμα κουκίδων 2, Εικόνα 2 παρακάτω). Εάν αποκτηθούν λιγότερα από 300 βασεόφιλα κύτταρα (π.χ. σε περίπτωση βασοπενίας), τα αποτελέσματα των εξετάσεων δεν μπορούν να αξιολογηθούν.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

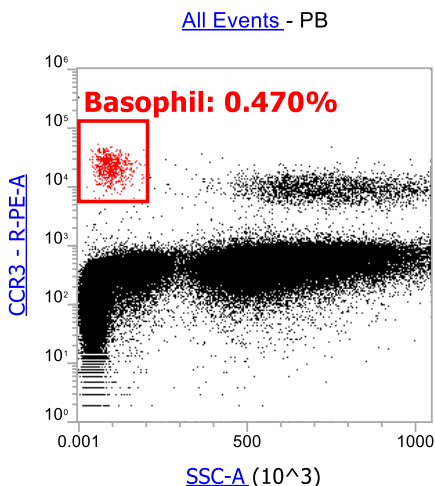
Τα αποκτηθέντα δεδομένα αναλύονται με το κατάλληλο λογισμικό ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής. Ορίστε παρόμοια διαγράμματα σημείων και gates όπως έγινε για την απόκτηση.

Τα gated που αναγνωρίζουν τα βασεόφιλα στο διάγραμμα σημείων 2 μπορούν να προσαρμοστούν ανεξάρτητα σε οποιοδήποτε από τις διαφορετικές διεγέρσεις για το ίδιο δείγμα ασθενούς.

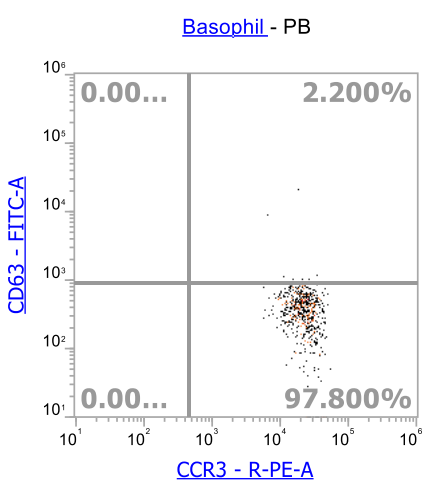
Για τη σωστή αξιολόγηση και τυποποίηση των αποτελεσμάτων, ορίζεται μια ρύθμιση υποβάθρου για κάθε ασθενή χρησιμοποιώντας τη διέγερση υποβάθρου ασθενούς (PB). Το σύνολο του gate τεταρτημορίου στο διάγραμμα σημείων 3 πρέπει να οριστεί στο PB. Για να τυποποιηθεί η ανάλυση, το gate έχει ρυθμιστεί να είναι μεταξύ 2 και 2,5% των ενεργοποιημένων βασεόφιλων στο δείγμα PB κάθε ασθενούς (βλ. Εικόνα 3).

Αυτό το gate πρέπει να εφαρμόζεται σε όλες τις επόμενες διεγέρσεις για τους ίδιους ασθενείς (PC1, PC2 και για όλα τα μετρούμενα αλλεργιογόνα) για να υπολογιστεί το ποσοστό των $CD63$ θετικών κυττάρων

σε οποιαδήποτε διέγερση (βλ. Εικόνα 4).

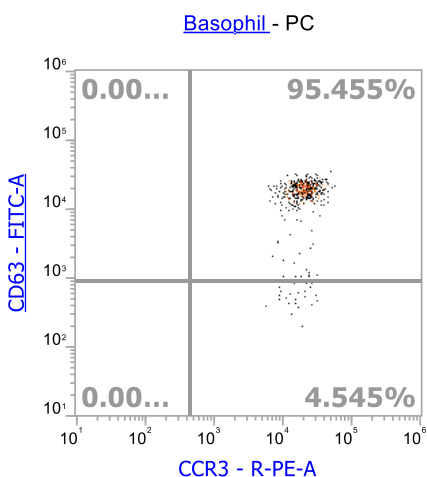


Εικόνα 2: Επιλογή των βασεόφιλων κυττάρων CCR3^{pos} / SSC^{low}



Οριοθετημένη Περιοχή	Μέτρηση (n=)	%
Συνολικά	125 864	100,0
Βασεόφιλα	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{neg})	578	97,8

Εικόνα 3: Υπόβαθρο Ασθενούς (PB) με μόνο STB



Οριοθετημένη Περιοχή	Μέτρηση (n=)	%
Συνολικά	130 926	100,0
Βασεόφιλα	506	0,39
Q2 (CD63 ^{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 ^{neg})	23	4,5

Εικόνα 4: Μάρτυρας Διέγερσης (STCON)

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Για έγκυρο αποτέλεσμα θα πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια και μέτρα ποιοτικού ελέγχου:

Πληθυσμοί λευκοκυττάρων: Τυπικά, τρεις διαφορετικοί πληθυσμοί λευκοκυττάρων, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα θα πρέπει να εμφανίζονται στο διάγραμμα FSC/SSC (βλ. Εικόνα 1). Η εμφάνισή τους μπορεί να θεωρηθεί ως κριτήριο για την ποιότητα του δείγματος αίματος (χρονικό διάστημα μεταξύ συλλογής δείγματος και εκτέλεσης της ανάλυσης, συνθήκες αποθήκευσης). Τα αποτελέσματα των εξετάσεων δεν μπορούν να αξιολογηθούν εάν αποκτηθούν λιγότερα από 300 βασεόφιλα.

Μάρτυρες (θετικοί) διέγερσης anti-FcεRI mAb και fMLP: Το anti-FcεRI mAb μιμείται τη γεφύρωση του υποδοχέα που προκαλείται από το αλλεργιογόνο *in vivo*. Το fMLP είναι ένα τριπεπτιδίο που προκαλεί ενεργοποίηση βασεόφιλων με μη ανοσολογικό τρόπο.

- Εάν ο Anti-FcεRI mAb μάρτυρας εμφανίζει τιμή $\geq 10\%$ των ενεργοποιημένων βασεόφιλων, τα δείγματα μπορούν να αξιολογηθούν.
- Εάν μόνο ο fMLP μάρτυρας εμφανίζει σήμα $\geq 10\%$, αλλά το Anti-FcεRI mAb δεν εμφανίζει, η ανάλυση έχει εκτελεστεί σωστά, αλλά τα αποτελέσματα της δοκιμής δεν μπορούν να αξιολογηθούν. Ο ασθενής θεωρείται ότι δεν ανταποκρίνεται σε IgE.
- Εάν τόσο το Anti-FcεRI mAb όσο και το fMLP παρουσιάζουν τιμές $<10\%$ των ενεργοποιημένων βασεόφιλων, είναι πιθανό να έχει γίνει τεχνικό σφάλμα. Το αποτέλεσμα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρείται άκυρο και η εξέταση πρέπει να επαναληφθεί.

ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Το Flow CAST[®] ανιχνεύει τον πληθυσμό των βασεόφιλων που εκφράζουν τον δείκτη επιφάνειας των κυττάρων CD63 ως % των συνολικών βασεόφιλων. Δεν υπάρχουν διεθνή ή εθνικά αναγνωρισμένα υλικά αναφοράς ή διαδικασίες μέτρησης αναφοράς για αυτήν την αναλυόμενη ουσία.

Η αναπαραγωγιμότητα από παρτίδα σε παρτίδα είναι εγγυημένη με τιτλοδότηση συζεύξεων των μονοκλωνικών αντισωμάτων anti-CD63-FITC και anti-CCR3-PE έναντι σφαιριδίων βαθμονόμησης. Για μια εκτίμηση της διακύμανσης από παρτίδα σε παρτίδα, παρακαλούμε ανατρέξτε στα αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας στην ενότητα «χαρακτηριστικά απόδοσης».

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Τα αποτελέσματα της δοκιμής Flow CAST[®] θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.
- Για τον προσδιορισμό των αλλεργικών διαταραχών που σχετίζονται με φάρμακα, η δοκιμή BAT θα πρέπει να

πραγματοποιηθεί εντός 6 μηνών από την αλλεργική αντίδραση (αναφ. 8).

- Βεβαιωθείτε ότι έχουν περάσει τουλάχιστον μία έως δύο εβδομάδες μετά από μια αλλεργική αντίδραση προτού εκτελέσετε τη δοκιμή BAT (αναφ. 8).
- Τα αρνητικά αποτελέσματα που λαμβάνονται για φαρμακευτικά αλλεργιογόνα δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για αποκλεισμό αλλεργιών.
- Αναμένεται ότι το 5 έως 10% των ασθενών θα είναι μη ανταποκρινόμενοι σε IgE. Για αυτούς τους ασθενείς δεν θα παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης CD63 και θετικό αποτέλεσμα. Τα άτομα που δεν ανταποκρίνονται μπορούν να εντοπιστούν χρησιμοποιώντας τους μάρτυρες διέγερσης που παρέχονται με τη δοκιμή Flow CAST® (αναφ. 9).
- Ανεπαρκώς γεμισμένα σωληνάρια K-EDTA (λιγότερο από μισογεμάτα) μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.
- Αναμένεται παρεμβολή στα αποτελέσματα της δοκιμής Flow CAST® για ασθενείς υπό θεραπεία με omalizumab (XOLAIR®) (αναφ. 10).
- Τα συστηματικά χορηγούμενα αντιαλλεργικά φάρμακα όπως τα κορτικοστεροειδή, το χρωμογλυκικό οξύ (DSCG) θα πρέπει να αποφεύγονται για τουλάχιστον 24 ώρες πριν από την αιμοληψία.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι κατηγορίες αποτελεσμάτων του Flow CAST® είναι οι εξής:

Αποτέλεσμα	Ερμηνεία
< cut-off	αρνητικό
≥ cut-off για τη μία ή και τις δύο αραιώσεις του αλλεργιογόνου.	θετικό

Πίνακας 3

CUT-OFF ΚΑΙ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ένα τεχνικό cut-off των 5% των ενεργοποιημένων βασεόφιλων έχει καθοριστεί, όπου αποτελέσματα ≥5% CD63^{pos} δείχνουν ενεργοποίηση βασεόφιλων.

Για κάθε αλλεργιογόνο επιτυγχάνεται βελτιωμένη ειδικότητα με τη χρήση των ειδικών για το αλλεργιογόνο cut-offs όπως υποδεικνύεται στα BÜHLMANN Allergen Εγχειρίδια.

Τα διαστήματα αναφοράς καθορίστηκαν σύμφωνα με το CLSI C28-A3. Εκατόν είκοσι (120) δείγματα αίματος από ένα κέντρο αιμοδοσίας διεγέρθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης ή Anti-FcεRI mAb και δοκιμάστηκαν σύμφωνα με τα πρότυπα πρωτόκολλα και τα πρωτόκολλα λύση-όχι πλύση. Η δοκιμή διεξήχθη κατά τη διάρκεια 26 ημερών, από τρεις χειριστές με δύο παρτίδες αντιδραστήριου Flow CAST®.

Μάρτυρας	Πρωτόκολλο Δοκιμασίας	Διάστημα Αναφοράς (90% CI) [% CD63 ^{pos}]	
		2.5th εκατοστημόριο	97.5th εκατοστημόριο
Ρυθμιστικό Διάλυμα Διέγερσης	πρότυπο	0,8 (0,5 – 1,2)	4,6 (4,1 – 6,4)
	λύση-όχι πλύση	0,9 (0,6 – 1,0)	4,2 (3,9 – 5,3)
Anti-FcεRI mAb	πρότυπο	18,0 (11,5 – 26,0)	97,7 (96,0 – 98,5)
	λύση-όχι πλύση	13,2 (11,4 – 21,2)	96,4 (94,3 – 97,3)

Πίνακας 4

ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ

Η κλινική απόδοση του Flow CAST® αξιολογήθηκε σε μια συστηματική επιστημονική βιβλιογραφική ανασκόπηση. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν έντεκα αξιολογημένες μελέτες που εντοπίστηκαν σε μια συστηματική βιβλιογραφία που κάλυπτε μια χρονική περίοδο έως τον Νοέμβριο του 2019, μία μελέτη για δηλητήρια εντόμων που δεν εντοπίστηκαν στην αρχική αναζήτηση και δύο μελέτες για αλλεργιογόνα φυτικών που δημοσιεύθηκαν μετά το 2019. Οι μελέτες διερεύνησαν την ικανότητα του Flow CAST® να διαφοροποιεί τα άτομα με αλλεργικές διαταραχές και τα μη αλλεργικά άτομα. Οι αλλεργικές διαταραχές στο αλλεργικό άτομο έχουν επιβεβαιωθεί είτε με α) το κλινικό ιστορικό του ασθενούς, β) με δοκιμασία πρόκλησης τροφής από το στόμα (OFC) ή δοκιμασία πρόκλησης, γ) κλινικό ιστορικό και εργαστηριακό έλεγχο (δερματικό τσίμπημα - SPT, sIgE) ή δ) κλινικό ιστορικό και OFC/ δοκιμασία πρόκλησης. Οι μελέτες που χρησιμοποιούσαν sIgE ή SPT ως αποκλειστική κλινική αναφορά αποκλείστηκαν. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 5.

Ομάδα Αλλεργιογόνων	N μελέτες	Μέση Ευαισθησία (εύρος)	Αλλεργικά άτομα (σύνολο)	Μέση Ειδικότητα (εύρος)	Μάρτυρες Άτομα (σύνολο)
Τρόφιμα Εισπνεόμενα	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Δηλητήρια Εντόμων	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Φάρμακα	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Πίνακας 5

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Εργαστηριακή ακρίβεια: ≤25% CV για διεγερτικό

Η επαναληψιμότητα (εντός λειτουργίας) και η ακρίβεια εντός του εργαστηρίου καθορίστηκαν με βάση την κατευθυντήρια γραμμή CLSI EP05-A3 και το πρότυπο ISO 15197:2013. Τέσσερα δείγματα αίματος δότη διεγέρθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης ή μάρτυρα διέγερσης anti-FcεRI mAb. Για την πρότυπη διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε ένα σχέδιο μελέτης 2 χειριστών x 4 ημέρες x 1 εκτέλεση x 4 επαναλήψεις. Για τη λύση-όχι πλύση, εφαρμόστηκε ένα σχέδιο μελέτης 2 χειριστών x 1 ημέρα x 4 εκτελέσεις x 4 επαναλήψεις. Μια επανάληψη αντιστοιχεί σε μια ανεξάρτητη αντίδραση διέγερσης και σε μια πλήρη διαδικασία ανάλυσης. Τα αποτελέσματα για το μάρτυρα διέγερσης anti-FcεRI mAb συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Πρωτόκολλο Δοκιμασίας	Δότης	Μέσο [%CD63]	n	Εντός λειτουργίας [%CV]	Μεταξύ μέρας (A) Μεταξύ εκτέλεσης (B)	
					[%CV]	Σύνολο [%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%

Πίνακας 6

Αναπαραγωγιμότητα: $\leq 25\%$ CV για διεγερτικό

Η αναπαραγωγιμότητα καθορίστηκε με βάση την κατευθυντήρια γραμμή CLSI EP05-A3 και το πρότυπο ISO 15197:2013. Τέσσερα δείγματα αίματος δότη διεγέρθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης ή μάρτυρα διέγερσης anti-FcεRI mAb. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε δύο εργαστηριακές θέσεις σύμφωνα με το πρότυπο πρωτόκολλο. Εφαρμόστηκε ένα σχέδιο μελέτης 3 οργάνων/παρτίδων x 2 χειριστές x 1 ημέρα x 5 επαναλήψεις. Μια επανάληψη αντιστοιχεί σε μια ανεξάρτητη αντίδραση διέγερσης και σε μια πλήρη διαδικασία ανάλυσης. Τα αποτελέσματα για το μάρτυρα διέγερσης anti-FcεRI mAb συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Δότης	Μέσο [%CD63]	n	Εντός λειτουργίας [%CV]	Μεταξύ χειριστών [%CV]	Μεταξύ παρτίδων/χειριστών [%CV]	Σύνολο [%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%

Πίνακας 7

ΠΑΡΕΜΒΑΛΟΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η ευαισθησία της ανάλυσης Flow CAST® σε φαρμακευτικά προϊόντα, σε μη φυσιολογικές συνθήκες αίματος και στο πρόσθετο δείγματος K-EDTA αξιολογήθηκε σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή CLSI EP07-A2. Το bias σε αποτελέσματα που υπερβαίνουν το 20% για το μάρτυρα διέγερσης anti-FcεRI mAb και το 20% CD63^{pos} (απόλυτο) για το μάρτυρα διέγερσης fMLP, θεωρήθηκε παρεμβολή. Δεν ανιχνεύθηκαν παρεμβολές στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις με τις ουσίες που αναφέρονται στον Πίνακα 8, στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις. Ανιχνεύτηκε παρεμβολή με K-EDTA σε διπλή συγκέντρωση σε σωληνάριο φλεβοκέντησης K-EDTA για έναν δότη.

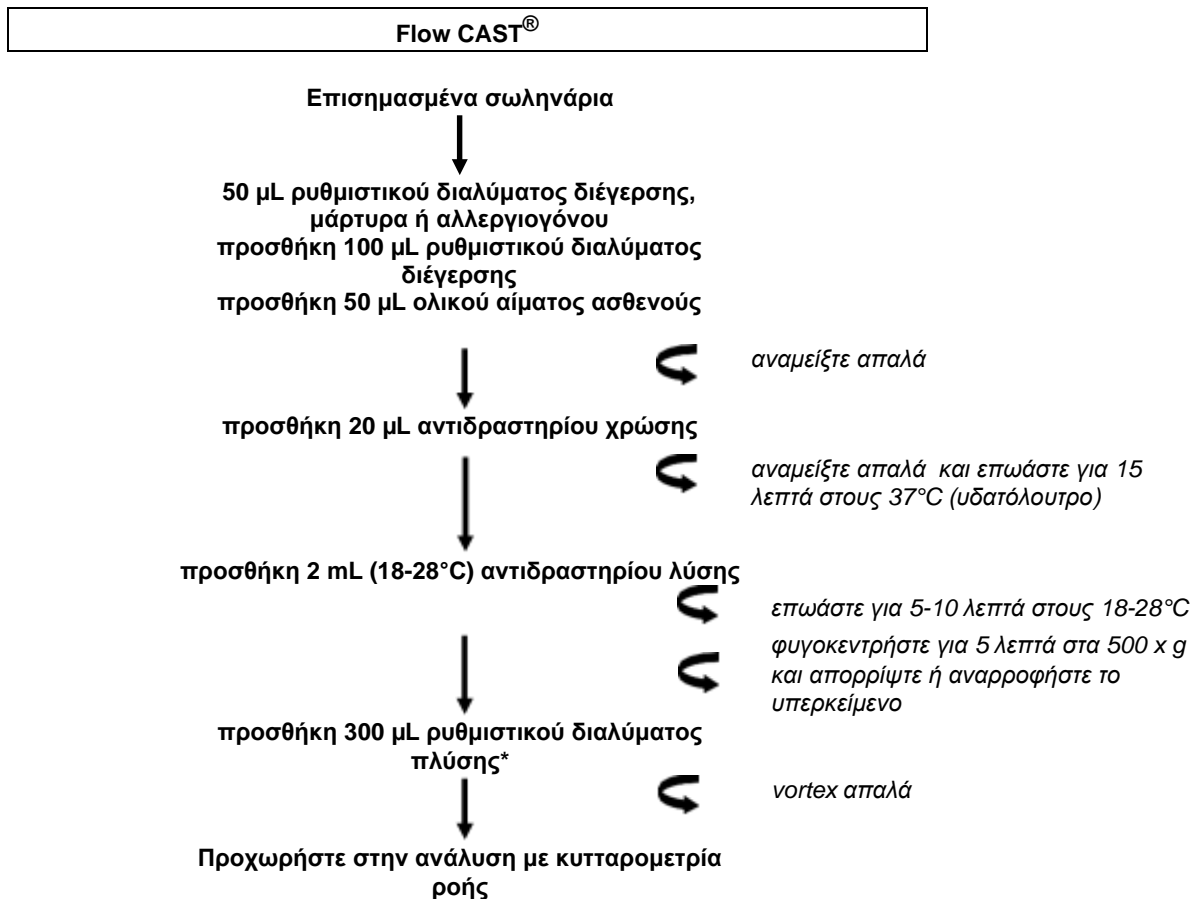
Ενεργό συστατικό	Συγκέντρωση Δοκιμής [μg/mL]
Fexofenadine hydrochloride	1,6
Cetirizine dihydrochloride	4,35
Hydroxyzine dihydrochloride	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednisone	1,2
N-Acetyl-L-tryptophan	30
Triglyceride (Intralipid)	20 000
Bilirubin conjugated	400
Bilirubin unconjugated	400
Hemolysis	56 100

Πίνακας 8

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

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).

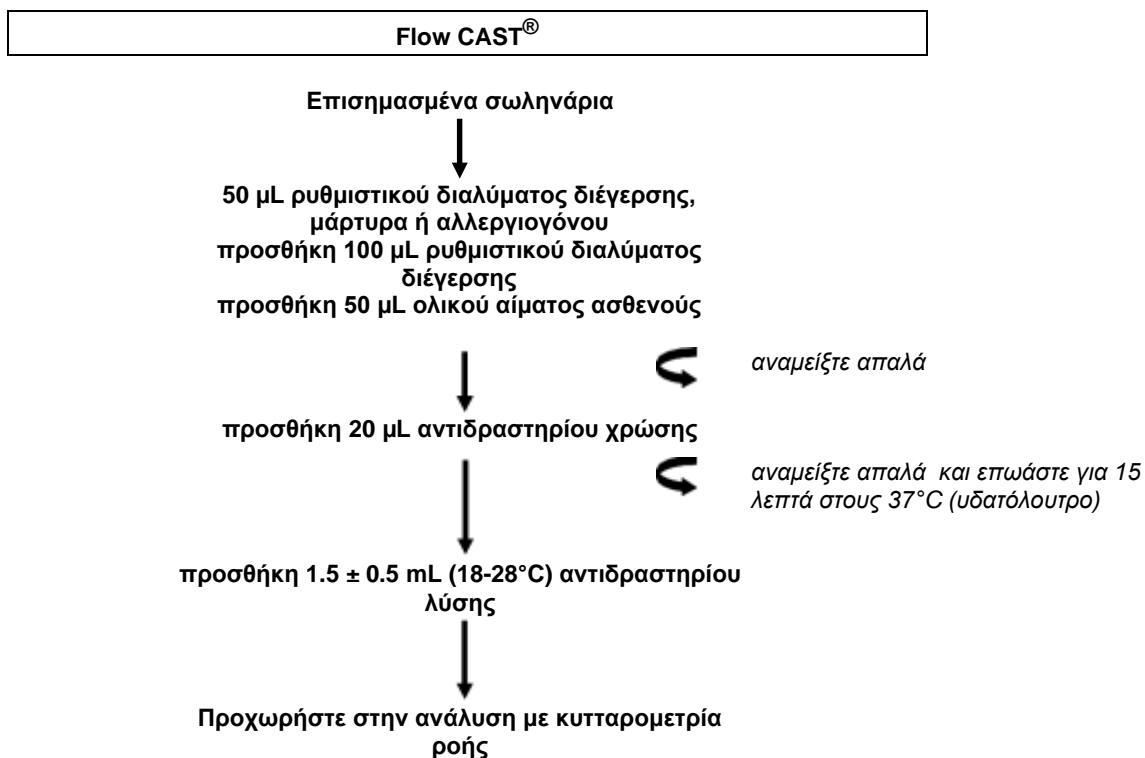
ΠΡΟΤΥΠΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ: ΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΛΥΣΗ



ΧΡΟΝΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ~30 ΛΕΠΤΑ / ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ: ~ 1 ΩΡΑ

* Σημείωση: Ανάλογα με τα όργανα του κυτταρομέτρου ροής που χρησιμοποιούνται, η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης θα πρέπει να προσαρμόζεται σε σχέση με τον dead όγκο και την πυκνότητα των κυττάρων που είναι συμβατή με το όργανο.

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ: ΛΥΣΗ-ΟΧΙ ΠΛΥΣΗ



ΧΡΟΝΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ~20 ΛΕΠΤΑ / ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ: ~ 1 ΩΡΑ

ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ ΑΛΛΑΓΩΝ

Ημερομηνία	Έκδοση	Αλλαγή
2023-06-21	A2	Αναδιατύπωση στο κεφάλαιο <i>Ανάλυση δεδομένων και Κλινική απόδοση</i> Συμπερίληψη του κοινοποιημένου αριθμού οργανισμού στο σήμα CE – διαδικασία αξιολόγησης συμμόρφωσης σύμφωνα με το IVDR 2017/746

ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΥΜΒΑΝΤΩΝ ΣΤΑ ΚΡΑΤΗ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΕ

Εάν έχει συμβεί οποιοδήποτε σοβαρό περιστατικό σε σχέση με αυτήν τη συσκευή, αναφέρετε χωρίς καθυστέρηση στον κατασκευαστή και την αρμόδια αρχή του κράτους μέλους σας.

ΦΘΟΡΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΣΤΟΛΗ

Παρακαλούμε ενημερώστε τον διανομέα σας, εάν αυτό το προϊόν παραλήφθηκε φθαρμένο.

ΣΥΜΒΟΛΑ

Η ΒÜHLMANN χρησιμοποιεί σύμβολα και σήματα που αναφέρονται και περιγράφονται στο ISO 15223-1. Επιπλέον χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα σύμβολα και σήματα:

Σύμβολα	Επεξήγηση
BUF STIM	Ρυθμιστικό Διάλυμα Διέγερσης
CONTROL STIM	Μάρτυρας Διέγερσης
CONTROL FMLP	Μάρτυρας Διέγερσης fMLP
REAG STAIN	Αντιδραστήριο Χρώσης
REAG LYS	Αντιδραστήριο Λύσης
BUF WASH	Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης