



# Flow CAST<sup>®</sup>

Prueba de activación de basófilos (BAT)  
Citometría de flujo

Para uso diagnóstico *in vitro*.

FK-CCR 100 análisis

Fecha de liberación: 2023-06-21  
Versión A2

---

 Fabricante

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



## USO PREVISTO

El kit BÜHLMANN Flow CAST® es una prueba de diagnóstico *in vitro* destinada a la evaluación cualitativa de la activación de los basófilos tras la estimulación con alérgenos específicos. La prueba consiste en una citometría de flujo con la que se determina la población de basófilos que expresa el marcador CD63 en la superficie celular en muestras de sangre total del paciente anticoaguladas con K-EDTA. Flow CAST® ha sido concebida como apoyo para el diagnóstico de los trastornos alérgicos, en conjunción con los signos clínicos y otros datos analíticos. Solo para uso en laboratorio.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

Flow CAST® es una prueba de activación de basófilos basada en la citometría de flujo (ref. 1, 2). La sangre total del paciente se estimula con alérgenos específicos, además de con tampón de estimulación y con controles de la estimulación, con el fin de analizar la desgranulación de sus basófilos *ex vivo*. La muestra se tiñe con dos anticuerpos monoclonales marcados con colorantes fluorescentes: con uno se seleccionan los basófilos (anti-CCR3-PE) y con el otro se determina su estado de activación (anti-CD63-FITC) (ref. 3-6). CD63 es una proteína transmembrana situada en las vesículas intracelulares que solo aflora a la superficie de la célula cuando el basófilo se desgranula (ref. 7).

Los hematíes se eliminan de la muestra del paciente mediante una reacción de lisis. Según el protocolo escogido las células se centrifugan, se resuspenden en tampón de lavado y se fijan antes de ser analizadas en el citómetro de flujo, o bien son analizadas directamente tras la lisis. Los basófilos son seleccionados entre la población de leucocitos por ser CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>. El estado de activación de los basófilos seleccionados se determina mediante la expresión de CD63 (marcador de la activación). Los pacientes que no generan una respuesta alérgica mediada por IgE, llamados no respondedores, se detectan a partir de los resultados de los controles positivos. El resultado del ensayo se indica en forma del porcentaje de basófilos que expresan CD63 con respecto a la cantidad total de basófilos (% de activación por expresión de CD63).

## REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Comentarios
<b>Tampón de estimulación</b> que contiene calcio, heparina e IL-3	1 vial liofilizado	B-CCR-STB	Reconstituir con 50 mL de agua <sup>1)</sup>
<b>Control de la estimulación</b> AcM anti-FcεRI	1 vial liofilizado	B-CCR-STCON	Reconstituir con 1,5 mL de B-CCR-STB
<b>Control de la estimulación fMLP <sup>2)</sup></b>	1 vial liofilizado	B-CCR-FMLP	Reconstituir con 1,5 mL de B-CCR-STB
<b>Reactivo de tinción</b> Mezcla de AcM anti-CD63-FITC y AcM anti-CCR3-PE	1 vial 2,2 mL	B-CCR-SR	Listo para usar
<b>Reactivo de lisis <sup>3)</sup></b> concentrado x10	1 vial 25 mL	B-CCR-LYR	Diluir con 225 mL de agua desionizada
<b>Tampón de lavado</b> con formaldehído al 0,1%	1 vial 100 mL	B-CCR-WB	Listo para usar

Tabla 1

<sup>1)</sup> Consulte los requisitos de calidad del agua en el apartado de "Precauciones técnicas".

<sup>2)</sup> N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

<sup>3)</sup> Durante la conservación a 2-8 °C se pueden formar cristales que deben ser disueltos a 18-28 °C antes de la dilución.

## CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Conservar a 2-8 °C. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos y reactivos reconstituídos	
Tampón de estimulación	Estable a -20 °C durante 6 meses Alicuotar si se prevé un uso repetido.
Control de estimulación	
Control de estimulación fMLP	
Reactivo de lisis	Estable a 2-8 °C durante 6 meses.
Reactivo de tinción	
Tampón de lavado	

Tabla 2

## MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Tubos de venopunción con K-EDTA
- Centrífuga
- Tubos de ensayo desechables para citometría de flujo de polipropileno o poliestireno apirógenos
- Gradillas para tubos de ensayo de citometría de flujo para la estimulación
- Agitador vórtex
- (Opcional) Placas de microtitulación (calidad para cultivo tisular) para la estimulación de las células y la tinción con el protocolo estándar
- (Opcional) Placas de pocillos profundos para la estimulación celular, la tinción, la lisis y la adquisición en el citómetro de flujo con el protocolo de lisis sin lavado.
- Pipetas de precisión con puntas desechables apirógenas:
  - 10-100 µL y 100-1000 µL,
  - Pipeta ajustable de 1-5 mL y
  - Opcional: Dispensador ajustable de 10-50 µL
- Probeta de 50 mL para reconstituir el tampón de estimulación
- Agua estéril, ultrapura y apirógena para reconstituir el tampón de estimulación (véase el apartado de "Precauciones técnicas")
- Baño María (recomendado) o estufa ajustada a 37 °C
- Agua destilada o desionizada y recipientes de vidrio de laboratorio adecuados para la dilución del reactivo de lisis
- Tapones o parafilm para tapar los tubos durante las fases de incubación
- Dispensadores para los frascos del reactivo de lisis y del tampón de lavado
- Citómetro de flujo equipado con una fuente láser de 488 nm (azul) y filtros de emisión para la detección de la PE y del FITC
- Software de análisis de la citometría de flujo (véase el apartado ICitometría de flujo Adquisición de datos)

## ALÉRGENOS NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS EN EL KIT

Los alérgenos validados para los análisis con Flow CAST® los suministra BÜHLMANN por separado. Consulte los folletos de alérgenos de BÜHLMANN para conocer los códigos de catálogo y la información referente a su preparación en nuestra página web:

www.buhlmannlabs.ch

**Importante:** Flow CAST® solo se ha probado con los alérgenos CAST® suministrados por BÜHLMANN Laboratories AG. Es responsabilidad exclusiva del laboratorio validar el uso de alérgenos que procedan de otras fuentes.

## PRECAUCIONES

### Precauciones de seguridad

- El tampón de estimulación (B-CCR-STB) de la prueba contiene componentes de origen humano. Aunque las pruebas de detección del antígeno de superficie del VHB y de los anticuerpos del VHC y del VIH1/2 hayan resultado negativas, los reactivos deben ser manipulados como si pudiesen transmitir infecciones y de acuerdo con las prácticas correctas de laboratorio, adoptando las precauciones oportunas.
- Evite el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las mucosas. Si se produce contacto, lávese de inmediato con agua en abundancia.
- Los reactivos y productos químicos deben tratarse como residuos peligrosos conforme a las normas nacionales de seguridad sobre riesgos biológicos.

### Precauciones técnicas

- Calidad del agua recomendada para Flow CAST®: Para garantizar una estimulación correcta y reproducible de los basófilos es esencial emplear agua estéril, ultrapura y apirógena para la reconstitución del tampón de estimulación (B-CCR-STB). Los tipos aptos son: agua de calidad para cultivo celular, agua de calidad para infusión o desionizada, agua bidestilada y ultrafiltrada con un filtro de 10 kDa esterilizado periódicamente.
- El reactivo de lisis (B-CCR-LYR) se puede reconstituir con agua desionizada, bidestilada o de la misma calidad empleada para la reconstitución del tampón de estimulación.
- Evitar la contaminación de alérgenos durante la estimulación de las células: Los alérgenos suspendidos en el aire del laboratorio pueden contaminar las muestras de sangre y las suspensiones de células que permanezcan abiertas, lo que puede provocar una elevada activación espontánea. Tapar bien los tubos de las muestras de sangre y los tubos de estimulación con el tapón o con parafilm. Evitar los ácaros del polvo doméstico, plantas que desprendan polen, los guantes de látex o cualquier equipo que pueda contener látex y mantener cerradas las ventanas del laboratorio donde se efectúe la estimulación celular. Es aconsejable llevar a cabo la preparación y la estimulación de las células en una cabina de flujo laminar.
- Es preferible usar un baño María y no una estufa, pues la transferencia de calor es más rápida. Si se usa una estufa, comprobar que la temperatura sea de 37 °C. Una temperatura mayor o menor puede alterar los resultados.
- Por lo general cabe esperar una escasa activación de los

basófilos con los alérgenos medicamentosos. Por tanto es esencial mantener las condiciones óptimas durante la estimulación, entre ellas la temperatura. Se recomienda el uso de tubos sueltos en lugar de placas de pocillos profundos para los alérgenos medicamentosos.

- No usar los componentes después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Evitar la contaminación de los reactivos.

### Procedimiento de ensayo

- Dejar atemperar el reactivo de lisis a temperatura ambiente (18-28 °C).
- Leer atentamente las instrucciones antes de la prueba. La prueba quedará alterada si los reactivos se diluyen o se manipulan incorrectamente o se conservan en condiciones distintas a las descritas en estas instrucciones de uso.
- Si las muestras no se manipulan correctamente pueden producirse resultados erróneos.
- Inspeccionar visualmente las preparaciones para valorar la eficacia de la lisis. Los hematíes deben estar parcialmente lisados y ocupar el mismo lugar que los leucocitos en el diagrama de puntos de difracción.
- Si la lisis dura demasiado se pueden perder células. Compruebe que dispone al menos de 300 basófilos para la adquisición de los datos. Aconsejamos que la adquisición de las muestras procesadas con el protocolo de lisis sin lavado se haga en el plazo máximo de una hora.
- Para evitar resultados erróneos en la citometría de flujo, alinear correctamente el citómetro, regular correctamente la compensación de la fluorescencia emitida y colocar cuidadosamente las regiones seleccionadas.

## OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Es aconsejable que los pacientes no tomen antialérgicos sistémicos como corticoesteroides o ácido cromoglicólico (DSCG) al menos durante las 24 horas anteriores a la extracción de la sangre.

Obtener la sangre con **tubos de venopunción con K-EDTA** llenándolos hasta la marca indicada. Los tubos deben llenarse al menos hasta la mitad. Un mililitro (1 mL) de sangre total es suficiente para llenar unos 18 tubos de ensayo.

**No centrifugar ni congelar las muestras de sangre.**

### Sangre total

Las muestras de sangre total conservadas a 2-8 °C han de procesarse en las 48 horas siguientes a la extracción.

Para la determinación de las alergias medicamentosas es aconsejable procesar las muestras de inmediato o como máximo en las 24 horas siguientes a la toma de la muestra. Las muestras de sangre total también se pueden mantener a temperatura ambiente (hasta 28 °C). Si se van a analizar con el protocolo estándar deben procesarse como máximo en las 24 horas siguientes a la toma, o el mismo día de la extracción si se opta por el protocolo de lisis sin lavado.

### Muestras procesadas

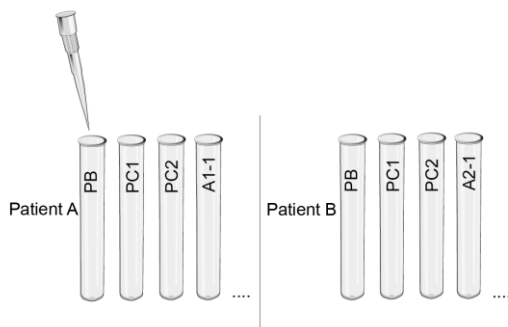
Las células procesadas con el protocolo estándar se fijan. Las células fijadas se pueden conservar durante 5 días a 2-

8 °C y protegidas de la luz hasta la adquisición en el citómetro de flujo.

## PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Mezclar la muestra de sangre anticoagulada invirtiendo varias veces el tubo de venopunción.
2. Preparar tubos nuevos para citometría de flujo de polipropileno o poliestireno apirógenos.
3. Etiquetar los tubos de cada paciente del modo siguiente (ejemplo):  
PB = activación espontánea del paciente (*background*)  
PC2 = control de estimulación con el AcM anti-FcεRI  
PC2 = control de estimulación con fMLP  
A1-1 para el alérgeno 1 con la dilución 1  
A1-2 para el alérgeno 1 con la dilución 2, etc.

50 µL de preparación de estimulación  
100 µL de tampón de estimulación (STB)  
50 µL de sangre  
20 µL de reactivo de tinción



### Estimulación y tinción

4. Añadir a cada tubo 50 µL de la preparación de estimulación que corresponda:  
Tubo PB: 50 µL de **tampón de estimulación** (activación espontánea del paciente)  
Tubo PC1: 50 µL de **control de la estimulación** AcM anti-FcεRI  
Tubo PC2: 50 µL de **control de la estimulación** fMLP  
Tubo Ax-y: 50 µL de **alérgeno**
5. Añadir a cada tubo 100 µL del tampón de estimulación (STB).
6. Añadir a cada tubo 50 µL de la sangre total del paciente. Asegúrese que no queden restos de sangre en las paredes y la boca del tubo.
7. Mezclar ligeramente.
8. Añadir a cada tubo 20 µL del reactivo de tinción (SR).
9. Mezclar ligeramente, tapar los tubos e incubar durante 15 minutos a 37 °C en un **baño María**.

**Nota:** Si en lugar del baño María se usa una estufa alargar el tiempo de incubación a 25 minutos, pues la transferencia de calor es más lenta.

### Lisis

**Nota:** El reactivo de lisis debe atemperarse a temperatura ambiente (18-28 °C).

#### Protocolo estándar: Lisis y lavado

10. Añadir a cada tubo 2 mL del reactivo de lisis atemperado (18-28 °C) y mezclar ligeramente.

11. Incubar durante 5-10 minutos a 18-28 °C.
  12. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 500 x g.
  13. Decantar el sobrenadante con papel secante.
  14. Resuspender el sedimento celular con 300 µL del tampón de lavado (el tampón contiene un fijador).
- Nota:** Según el modelo de citómetro de flujo puede ser necesario ajustar el volumen de tampón de lavado, en función del volumen muerto y de la densidad celular que admita el aparato.
15. Agitar ligeramente con el vórtex.

**Pasar a 16a:** adquisición de las muestras en el citómetro de flujo.

**O a 16b:** si la adquisición no se efectúa de inmediato, dejar las muestras en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz (fijación). Guardar las muestras bien cerradas y protegidas de la luz a 2-8 °C hasta la medición. Las células fijadas se pueden conservar durante 5 días a 2-8 °C hasta la adquisición en el citómetro de flujo. Agitar suavemente los tubos de muestras antes de la adquisición.

**Nota:** Las muestras fijadas guardadas se pueden introducir en el citómetro en cualquier momento, sin que precisen ningún pretratamiento. Véanse los tiempos de conservación en el apartado "Obtención y conservación de las muestras". Si las muestras permanecen guardadas mucho tiempo se puede observar un leve descenso de la intensidad de la fluorescencia y una menor recuperación de basófilos  $\geq 80\%$ .

#### Protocolo alternativo: Protocolo de lisis sin lavado

Los citómetros de flujo de alta resolución más avanzados son capaces de analizar muestras lisadas sin lavar. Es preciso adaptar este procedimiento al modelo de citómetro empleado, lo cual puede exigir ajustes de optimización. El protocolo indicado a continuación sería para la adquisición de datos en un citómetro NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher).

10. Realizar las fases 1 a 9 del ensayo (antes indicadas) y continuar en el paso 10 indicado aquí. Añadir a cada tubo  $1,5 \pm 0,5$  mL de reactivo de lisis atemperado a 18-28 °C, mezclar ligeramente (ajustar el volumen en función de la velocidad de adquisición que admita el citómetro de flujo).
11. Proceder a la adquisición de las muestras en el citómetro de alta resolución con una velocidad de adquisición elevada para reducir al mínimo la duración del análisis.

**Nota:** Las muestras deben ser analizadas en las 24 horas siguientes a su recepción. Véase el apartado "Obtención y conservación de las muestras".

## ADQUISICIÓN DE LOS DATOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La adquisición se puede efectuar en cualquier citómetro de flujo que opere con un diodo láser de argón a 488 nm (luz de excitación azul-verde).

El citómetro debe estar equipado para detectar la dispersión anterógrada (FSC), la dispersión lateral (SSC) y los dos fluorocromos FITC y PE.

Comprobar que el citómetro esté correctamente alineado y que esté activada la compensación de los colores.

La correcta adquisición y caracterización de los basófilos en reposo y activados exige la creación de los diagrama de puntos siguientes:

1. Generar el primer diagrama de puntos donde se compara la dispersión anterógrada (FSC) con la lateral (SSC) para adquirir la población entera de leucocitos, como se muestra en la Figura 1. Durante la adquisición de las muestras verificar que en el diagrama de puntos de FSC/SSC queda separada la población de leucocitos en tres poblaciones distintas (linfocitos, monocitos y granulocitos). Ajustar la amplificación (la ganancia) de las señales de FSC y SSC para obtener una distribución similar a la visible en la Figura 1. Consulte el manual de instrucciones del citómetro de flujo.
2. Generar el segundo diagrama de puntos, comparando CCR3-PE con la dispersión lateral, como se muestra en la Figura 2. Configurar una ventana de selección (basófilos, p. ej.) que abarque toda la población de basófilos como CCR3<sup>pos</sup> y SSC<sup>low</sup> (SSC<sup>baja</sup>) como se muestra en la ventana rectangular de la Figura 2. Los eosinófilos, que también son CCR3<sup>pos</sup>, quedarán excluidos por su SSC elevada.
3. Generar el tercer diagrama de puntos, donde se compara CD63-FITC con CCR3-PE, que solo contendrá los basófilos seleccionados, como se muestra en la Figura 3. Con los basófilos en reposo sin estimular del tubo de actividad espontánea (PB, *background*) del paciente configurar la ventana de selección, en la cual los basófilos CD63- quedarán situados en el cuadrante inferior derecho (CD63<sup>neg</sup> CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>), como se muestra en la Figura 3. Los basófilos activados por la estimulación presentes en los tubos de los controles positivos y en los que contienen alérgenos específicos conformarán la población de basófilos CD63+ (CD63<sup>pos</sup>/CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>), que aparecerá en el cuadrante superior derecho, como se observa en la Figura 4 con un ejemplo de estimulación con control positivo (STCON).

El resultado del ensayo es la proporción de basófilos CD63+ con respecto al total de basófilos (% de activación por expresión de CD63), que aparecen en el cuadrante selectivo del tercer diagrama de puntos en cualquiera de los tubos de estimulación.

el segundo diagrama de puntos, Figura 2 abajo). El resultado de la prueba no es evaluable si se adquieren menos de 300 células basófilas (p. ej. en caso de basopenia).

## ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos adquiridos se analizan con el software de citometría de flujo adecuado. Configurar diagrama de puntos y ventanas de selección que sean similares a los de la adquisición.

Las ventanas de selección que identifican a los basófilos en el segundo diagrama de puntos se pueden adaptar independientemente en cualquiera de las estimulaciones realizadas con una misma muestra del paciente.

A fin de que la evaluación y la estandarización de los resultados sean correctas es preciso determinar un valor de activación espontánea de cada paciente con la estimulación pertinente (PB). Definir el cuadrante de la ventana de selección del tercer diagrama de puntos con el tubo PB. Para estandarizar el análisis, la selección debe fijarse entre el 2 % y el 2,5 % de los basófilos activados en la muestra de PB de cada paciente (véase la Figura 3).

Los parámetros de esta ventana de selección deben aplicarse a las demás estimulaciones del mismo paciente (PC1, PC2 y todos los alérgenos medidos) para calcular el porcentaje de células CD63+ (véase la Figura 4).

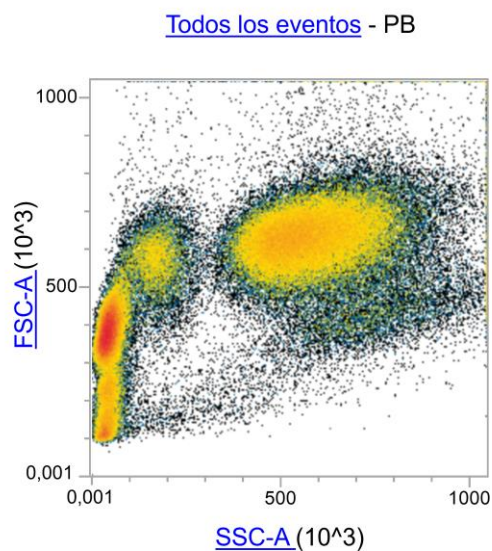


Figura 1: Las tres poblaciones diferenciadas visibles en el diagrama de puntos de FSC/SSC (linfocitos, monocitos y granulocitos).

Adquirir al menos 500 células basófilas de cualquiera de los tubos de estimulación (seleccionados como se muestra en

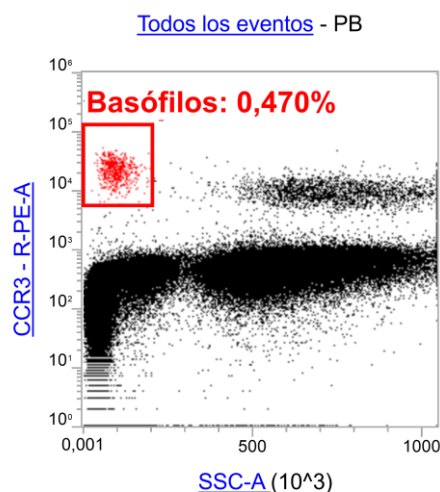
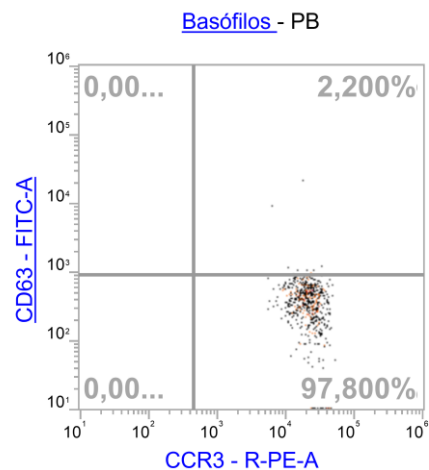


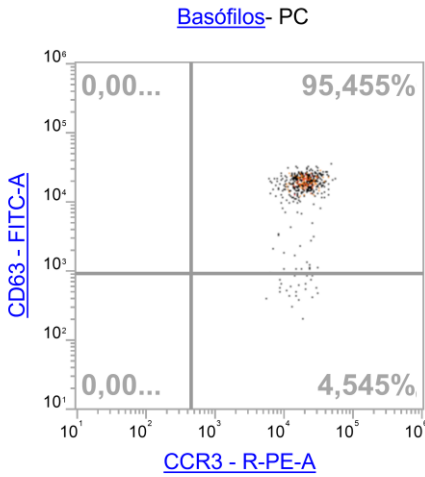
Figura 2: Selección de células basófilas CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>





Región seleccionada	Recuento (n=)	%
Total	125 864	100,0
Basófilos	591	0,47
Q2 (CD63 <sub>pos</sub> )	13	2,2
Q4 (CD63 <sub>neg</sub> )	578	97,8

Figura 3: Activación espontánea del paciente (PB) solo con tampón de estimulación (STB)



Región seleccionada	Recuento (n=)	%
Total	130 926	100,0
Basófilos	506	0,39
Q2 (CD63 <sub>pos</sub> )	483	95,5
Q4 (CD63 <sub>neg</sub> )	23	4,5

Figura 4: Control de la estimulación (STCON)

## CONTROL DE CALIDAD

Para que el resultado sea válido deben cumplirse los siguientes criterios y parámetros de control de calidad:

**Poblaciones de leucocitos:** En el diagrama FSC/SSC deben ser visibles tres poblaciones diferenciadas de leucocitos: linfocitos, monocitos y granulocitos (véase la Figura 1). La aparición de las tres se considera un criterio de calidad de la muestra de sangre (tiempotranscurrido desde la extracción hasta el análisis y condiciones de conservación de la muestra). El resultado de la prueba no es evaluable si se adquieren menos de 300 basófilos.

**Controles de estimulación (positivos) con AcM anti-FcεRI y fMLP:** El AcM anti-FcεRI replica el puenteo de los receptores que provoca el alérgeno *in vivo*. El fMLP es un tripéptido que estimula la activación de los basófilos a través de mecanismos no inmunitarios.

- La muestra es evaluable si el valor de los basófilos activados que muestra el control de AcM anti-FcεRI es  $\geq 10$  %.
- Si la señal  $\geq 10$  % solo se observa en el control fMLP, pero no en el de AcM FcεRI, la ejecución del ensayo es correcta pero el resultado no es evaluable. Se considera que el paciente no genera una respuesta de IgE.
- Si tanto el valor de los basófilos activados del AcM anti-FcεRI como del fMLP es  $<10$  % lo más probable es que se trate de un error técnico. El resultado será inválido y habrá que repetir la prueba.

## ESTANDARIZACIÓN

Flow CAST® detecta la población de basófilos que expresan en su superficie el marcador CD63 con respecto al total de basófilos (%). No hay materiales de referencia ni procedimientos de medición estandarizados a escala nacional o internacional para este analito.

La reproducibilidad interlotes queda garantizada con la titulación de los conjugados de anticuerpos monoclonales anti-CD63-FITC y anti-CCR3-PE con respecto a microesferas de calibración. En el apartado “Eficacia diagnóstica” se puede consultar una estimación de la variación interlotes con los resultados de los ensayos de reproducibilidad.

## LIMITACIONES

- Los resultados de la prueba Flow CAST® se deben interpretar en conjunción con los signos clínicos y otros datos analíticos.
- Para determinar si el paciente sufre una alergia a medicamentos, la prueba BAT debe efectuarse como máximo 6 meses después de la reacción alérgica (ref. 8).
- Y cerciorarse de que hayan transcurrido al menos 1 o 2 semanas desde la reacción alérgica antes de realizar la prueba (ref. 8).
- Un resultado negativo en la prueba de alérgenos medicamentosos no excluye con certeza la alergia;
- se calcula que entre el 5% y el 10% de los pacientes no generan una respuesta de IgE. En estos pacientes no se observa un aumento de la expresión de CD63 y, por tanto, tampoco un resultado positivo, pero es posible detectarlos con los controles de estimulación que se suministran con la prueba Flow CAST® (ref. 9).
- Si los tubos con K-EDTA no se llenan lo suficiente, al menos hasta la mitad, pueden arrojar falsos negativos.
- El tratamiento con omalizumab (XOLAIR®) previsiblemente provoca interferencias con los resultados de Flow CAST® (ref. 10).
- No se deben administrar antialérgicos sistémicos como corticoesteroides o ácido cromoglicólico (DSCG) durante las 24 horas previas a la extracción de las muestras de sangre.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de Flow CAST® pueden ser:

Resultado	Interpretación
$<$ valor de corte ( <i>cut-off</i> )	negativo
$\geq$ valor de corte ( <i>cut-off</i> ) de una o ambas diluciones del alérgeno.	positivo

Tabla 3

## VALOR DE CORTE E INTERVALO DE REFERENCIA

El valor de corte técnico (*cut-off*) para los basófilos activados se ha fijado en el 5 %, de modo que cualquier resultado de células CD63<sub>pos</sub> que sea  $\geq 5$  % se interpretará como activación de los basófilos.

La especificidad mejorada para cada alérgeno se logra aplicando los valores de corte específicos de cada alérgeno,

que aparecen indicados en los prospectos de alérgenos BÜHLMANN.

Los intervalos de referencia se han definido conforme a las directrices C28-A3 del CLSI. Se estimularon 120 muestras de sangre procedentes de un centro de donación con tampón de estimulación o con AcM anti-FcεRI y se analizaron siguiendo el protocolo estándar y el protocolo de lisado sin lavado. Los análisis se llevaron a cabo a lo largo de 26 días por 3 operarios con dos lotes de reactivos Flow CAST®.

Control	Ensayo Protocolo	Intervalo de referencia (IC 90 %) [% CD63 <sup>pos</sup> ]	
		Percentil 2,5	Percentil 97,5
Tampón de estimulación	Estándar	0,8 (0,5 - 1,2)	4,6 (4,1 - 6,4)
	Lisis sin lavado	0,9 (0,6 - 1,0)	4,2 (3,9 - 5,3)
AcM anti-FcεRI	Estándar	18,0 (11,5 - 26,0)	97,7 (96,0 - 98,5)
	Lisis sin lavado	13,2 (11,4 - 21,2)	96,4 (94,3 - 97,3)

Tabla 4

## EFICACIA CLÍNICA

La eficacia clínica de Flow CAST® ha sido evaluada con una revisión sistemática de la bibliografía científica. En la búsqueda bibliográfica se encontraron 11 estudios revisados por pares hasta noviembre 2019; en el análisis también se incluyó otro estudio sobre venenos de insectos que no se había encontrado en esa primera búsqueda y dos estudios con alérgenos del cacahuete publicados después de 2019. Los estudios investigaron la capacidad de Flow CAST® para diferenciar entre sujetos con trastornos alérgicos y sujetos no alérgicos. Los trastornos alérgicos en el sujeto alérgico se han confirmado mediante a) el historial clínico del paciente, b) la prueba de provocación oral con alimentos (OFC) o la prueba de provocación, c) el historial clínico y las pruebas de laboratorio (punción cutánea - SPT, slgE) o d) el historial clínico y la OFC/prueba de provocación. Quedaron excluidos los estudios en que la única referencia clínica eran las slgE o la prueba intradérmica. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Grupo de alérgenos	N estudios	Sensibilidad mediana (intervalo)	Sujetos alérgicos (total)	Especificidad mediana (intervalo)	Sujetos de control (total)
Alimentarios	5	92 % (81-100 %)	311	93 % (80-100 %)	240
Inhalados					
Venenos de insectos	2	87 % (73-89 %)	79	96 % (95-97 %)	39
Medicamentos	7	55 % (0-68 %)	227	91 % (79-100 %)	167

Tabla 5

## EFICACIA DIAGNÓSTICA

### Precisión intralaboratorial: ≤25 % CV de la preparación de estimulación

La repetibilidad (intraserial) y la precisión intralaboratorial se definieron conforme a la directriz EP05-A3 del CLSI y la norma ISO 15197:2013. Se estimularon cuatro muestras de sangre de donante con el tampón de estimulación o con el control de estimulación a base del AcM anti-FcεRI. En el procedimiento estándar se aplicó un diseño de 2 operarios x 4 días x 1 serie x 4 réplicas. En el procedimiento con lisis sin lavado se aplicó un diseño de 2 operarios x 1 día x 4 series x 4 réplicas. La réplica es una reacción de estimulación independiente sometida al proceso de ensayo

entero. Los resultados del control de estimulación con AcM anti-FcεRI aparecen resumidos en la Tabla 6.

Protocolo de ensayo	Donante	Media [%CD63]	n	Intraserial %CV	Interdia (A) Interserial (B) [%CV]	Total [%CV]
Estándar (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 %
Lisis sin lavado (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 %

Tabla 6

### Reproducibilidad: ≤25% CV de la preparación de estimulación

La reproducibilidad se determinó conforme a directriz EP05-A3 del CLSI y la norma ISO 15197:2013. Se estimularon cuatro muestras de sangre de donante con el tampón de estimulación o con el control de estimulación a base del AcM anti-FcεRI. Las muestras se analizaron en dos laboratorios distintos siguiendo el protocolo estándar. Se aplicó un diseño de 3 aparatos/lotos x 2 operarios x 1 día x 5 réplicas. La réplica es una reacción de estimulación independiente sometida al proceso de ensayo entero. Los resultados del control de estimulación con AcM anti-FcεRI aparecen resumidos en la Tabla 7.

Donante	Media [%CD63]	n	Intraserial [%CV]	Interoperario [%CV]	Interlote/ Interinstrumento [%CV]	Total [%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 %

Tabla 7

## SUSTANCIAS INTERFERENTES

La sensibilidad del ensayo Flow CAST® a los fármacos, a la sangre en condiciones anormales y al aditivo K-EDTA de la muestra se analizó conforme a la directriz EP07-A2 del CLSI. Se consideró interferencia toda desviación superior al 20 % de las células CD63<sup>pos</sup> (recuento absoluto) observada en el control de estimulación con AcM anti-FcεRI y en el control de estimulación FMLp. No se han detectado interferencias con las concentraciones de las sustancias que aparecen indicadas en la Tabla 8. Se detectó interferencia con el K-EDTA en un tubo de venopunción de un donante que contenía el doble de concentración de esta sustancia.

Componente activo	Concentración analizada [µg/mL]
Clorhidrato de fexofenadina	1,6
Diclorhidrato de cetirizina	4,35
Diclorhidrato de hidroxizina	0,27
Ketotifeno	0,6
Montelukast	3,84
Prednisona	1,2
N-acetil-L-triptófano	30
Triglicérido (intralípido)	20 000
Bilirrubina conjugada	400
Bilirrubina no conjugada	400
Hemólisis	56 100

Tabla 8



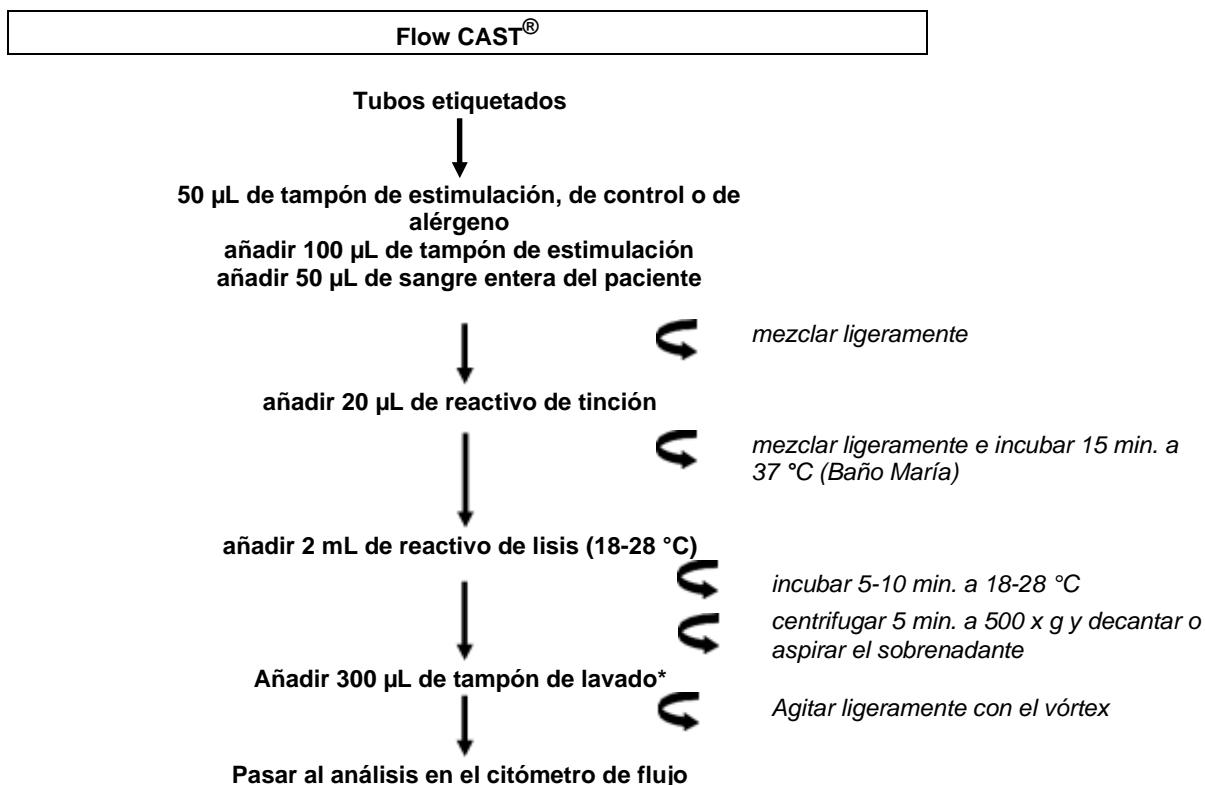
---

## REFERENCIAS

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. Uguccioni, 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).

## PROTOSCOLOS ABREVIADOS

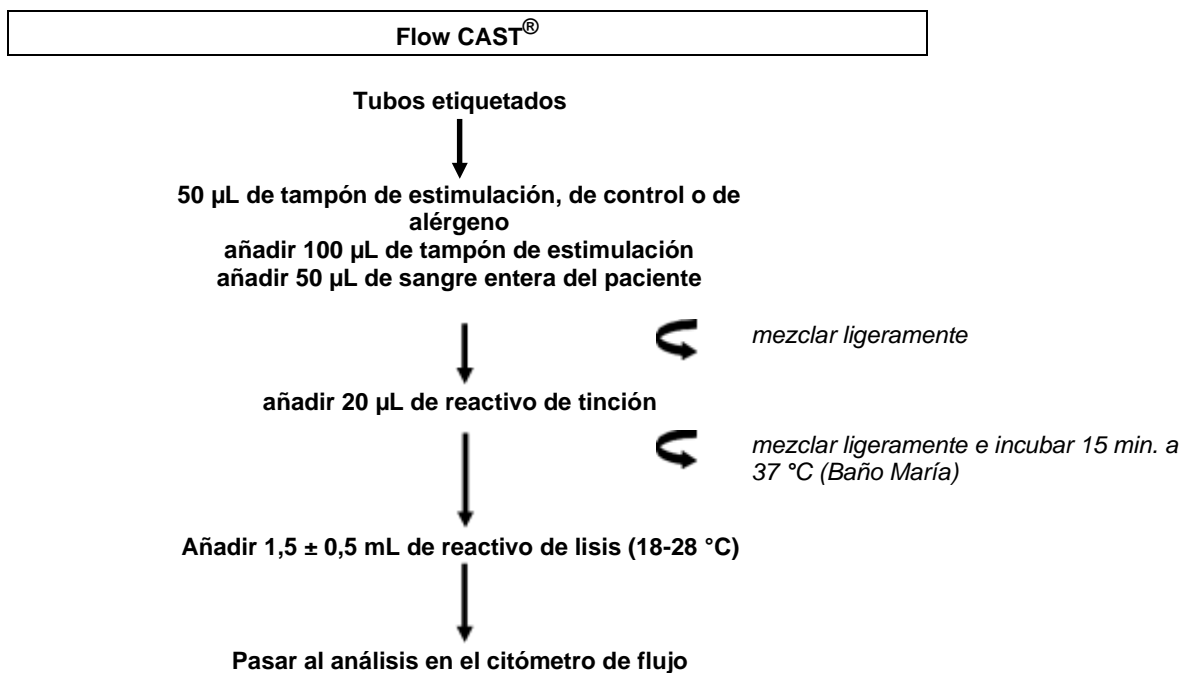
### PROTOSCOLO ESTÁNDAR: LISIS Y LAVADO



TIEMPO DE ADQUISICIÓN ~30 MIN / TIEMPO PARA OBTENER EL RESULTADO: ~ 1 HORA

\* Nota: Según el modelo de citómetro de flujo puede ser necesario ajustar el volumen de tampón de lavado, en función del volumen muerto y de la densidad celular que admita el aparato.

### PROTOSCOLO ALTERNATIVO: PROTOSCOLO DE LISIS SIN LAVADO



TIEMPO DE ADQUISICIÓN ~ 20 MIN/ TIEMPO PARA OBTENER EL RESULTADO: ~ 1 HORA

---

**REGISTRO DE LOS CAMBIOS**

<b>Fecha</b>	<b>Versión</b>	<b>Cambio</b>
2023-06-21	A2	Nueva redacción del capítulo <i>Análisis de datos y rendimiento clínico</i> Incorporación del número del organismo notificado al mercado CE – procedimiento de evaluación de la conformidad con arreglo al Reglamento IVDR 2017/746

---

**NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES EN LOS ESTADOS MIEMBROS DE LA UE**

Si se produce algún incidente grave en relación con este dispositivo, informe inmediatamente al fabricante y a la autoridad competente

## SÍMBOLOS

BÜHLMANN usa símbolos y signos listados y descritos en la norma ISO 15223-1. Además se usan los símbolos y signos siguientes:

Símbolo	Explicación
BUF   STIM	Tampón de estimulación
CONTROL   STIM	Control de estimulación
CONTROL   FMLP	Control de estimulación fMLP
REAG   STAIN	Reactivo de tinción
REAG   LYS	Reactivo de lisis
BUF   WASH	Tampón de lavado

