



Flow CAST[®]

Test di attivazione dei basofili (BAT)
Citometria a flusso

Per uso diagnostico *in vitro*

FK-CCR 100 test

Data di pubblicazione: 2023-06-21
Versione A2

 **Produttore**

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

USO PREVISTO

BÜHLMANN Flow CAST® è un test diagnostico *in vitro* per la valutazione qualitativa dell'attivazione dei basofili in seguito a stimolazione con specifici allergeni. Il test utilizza la citometria a flusso per determinare la popolazione di basofili che esprimono il marcatore di superficie cellulare CD63 in campioni di sangue intero K-EDTA. Flow CAST® è inteso come aiuto alla diagnosi di disturbi allergici di tipo immediato e va utilizzato insieme ad altre evidenze cliniche e di laboratorio.

Solo per uso di laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Flow CAST® è un test di attivazione dei basofili basato su citometria a flusso (rif. 1, 2). Campioni di sangue intero prelevato dai pazienti sono stimolati con specifici allergeni, un tampone di stimolazione e controlli di stimolazione, al fine di valutare la degranolazione dei basofili *ex vivo*. Il campione è colorato usando due anticorpi monoclonali marcati con sostanze fluorescenti: uno per la selezione dei basofili (anti-CCR3-PE) e uno per la determinazione dello stato di attivazione dei basofili (anti-CD63-FITC) (rif. 3-6). Il marcatore CD63 è una proteina transmembrana presente sulle vescicole intracellulari e situata sulla superficie cellulare unicamente a seguito della degranolazione dei basofili (rif. 7).

Gli eritrociti presenti nel campione del paziente sono rimossi tramite una reazione di lisi. A seconda del protocollo, le cellule possono essere centrifugate, rimesse in sospensione in soluzione tampone di lavaggio e fissate per la successiva analisi con citometria a flusso, oppure analizzate direttamente dopo la lisi. I basofili sono selezionati dalla popolazione di leucociti in base a CCR3^{pos}/SSC^{low}. Lo stato di attivazione dei basofili identificati è determinato dall'espressione CD63 (marcatore di attivazione). I pazienti i cui basofili non producono risposte allergiche IgE-mediate, detti non-rispondenti, sono identificati in base ai risultati dei controlli positivi. La lettura del test è espressa come rapporto tra basofili CD63 positivi e l'intera popolazione di basofili (% attivazione CD63).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tampone di stimolazione contenente calcio, eparina e IL-3	1 flacone liofilizzata	B-CCR-STB	Ricostituire con 50 mL d'acqua ¹⁾
Controllo di stimolazione anticorpo monoclonale anti-FcεRI	1 flacone liofilizzata	B-CCR-STCON	Ricostituire con 1.5 mL di B-CCR-STB
Controllo di stimolazione fMLP ²⁾	1 flacone liofilizzata	B-CCR-FMLP	Ricostituire con 1.5 mL di B-CCR-STB
Reagente colorante Mix di anticorpi monoclonali anti-CD63-FITC e anti-CCR3-PE	1 flacone 2.2 mL	B-CCR-SR	Pronto all'uso
Reagente di lisi ³⁾ Concentrazione 10x	1 flacone 25 mL	B-CCR-LYR	Diluire con 225 mL di acqua deionizzata
Tampone di lavaggio con formaldeide 0.1%	1 flacone 100 mL	B-CCR-WB	Pronto all'uso

Tabella 1

¹⁾ Per informazioni sui requisiti di qualità dell'acqua, consultare il capitolo Precauzioni tecniche

²⁾ N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

³⁾ Il reagente potrebbe cristallizzarsi durante la conservazione a 2-8°C e richiede dissoluzione a 18-28°C prima della diluizione

CONSERVAZIONE E DURATA DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
Conservare a 2-8 °C. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti e ricostituiti	
Tampone di stimolazione	Stabile a -20°C per 6 mesi. Aliquotare se si prevede un utilizzo ripetuto.
Controllo di stimolazione	
Controllo di stimolazione fMLP	
Reagente di lisi	Stabile a 2-8°C per 6 mesi.
Reagente colorante	
Tampone di lavaggio	

Tabella 2

MATERIALI OCCORRENTI MA NON FORNITI

- Provette per venipuntura K-EDTA
- Centrifuga
- Provette monouso non pirogene in polipropilene o polistirene per citometria a flusso
- Porta provette per citometria a flusso per la stimolazione
- Miscelatore vortex
- (Opzionale) piastre per microtitolazione idonee a coltura tissutale per la stimolazione e colorazione delle cellule secondo protocollo standard
- (Opzionale) piastre a pozzetto profondo (deep well) per la stimolazione, colorazione, lisi e acquisizione in citometria a flusso per il protocollo 'lyse-no-wash'
- Pipettatori di precisione con puntali monouso non pirogeni:
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - pipettatore regolabile 1-5 mL e
 - Opzionale: dosatore regolabile 10-50 µL
- Cilindro da 50 mL per la ricostituzione del tampone di stimolazione
- Acqua sterile, ultrapura e non pirogena per la ricostituzione del tampone di stimolazione (consultare il capitolo Precauzioni tecniche)
- Bagnomaria (consigliato) o incubatore impostato a 37°C
- Acqua distillata o deionizzata e vetreria da laboratorio adeguata alla diluizione dei reagenti di lisi
- Coperchi o pellicole per coprire le provette durante i passaggi di incubazione
- Tappi dosatore per reagenti di lisi e tampone di lavaggio
- Citometro a flusso equipaggiato con una sorgente laser a 488 nm (blu) e filtri di emissione per rilevamento di PE e FITC
- Software per analisi di citometria a flusso (consultare il capitolo Acquisizione dati di citometria a flusso)

ALLERGENI DA ORDINARE SEPARATAMENTE

BÜHLMANN offre allergeni convalidati per il test Flow CAST® da ordinare separatamente. Codici ordine e informazioni sulle procedure di preparazione degli allergeni sono disponibili sugli opuscoli BÜHLMANN Allergen Booklet sul sito Web di BÜHLMANN:

www.buhlmannlabs.ch

Importante: Il test Flow CAST® è stato convalidato unicamente con allergeni CAST® disponibili da BÜHLMANN Laboratories AG. La convalida dell'utilizzo di allergeni ottenuti da altre fonti è esclusiva responsabilità del laboratorio utilizzatore.

PRECAUZIONI

Precauzioni per la sicurezza

- Il tampone di stimolazione (B-CCR-STB) di questo test contiene componenti di origine umana. Sebbene i reagenti siano stati testati per l'antigene di superficie del virus HBV e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV1/2 e siano risultati negativi, vanno considerati come potenziali vettori di infezioni e quindi maneggiati secondo le buone pratiche di laboratorio (GLP) adottando le precauzioni del caso.
- Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua.
- I reagenti e le sostanze chimiche devono essere trattati come rifiuti pericolosi e smaltiti in conformità con le linee guida o le normative nazionali in materia di sicurezza dei materiali a rischio biologico.

Precauzioni tecniche

- Raccomandazioni in merito alla qualità dell'acqua per il test Flow CAST®: È essenziale utilizzare acqua sterile, ultrapura e non pirogena per la ricostituzione del tampone di stimolazione (B-CCR-STB) al fine di ottenere risultati di stimolazione dei basofili di buona qualità e riproducibili. È possibile utilizzare acqua dei seguenti tipi: acqua per coltura cellulare, acqua per preparazione iniettabili o acqua deionizzata e bidistillata ultrafiltrata in un ultrafiltro 10 kDa sottoposto a sanificazione periodica.
- Il reagente di lisi (B-CCR-LYR) può essere ricostituito con acqua deionizzata bidistillata o di qualità analoga a quella utilizzata per la ricostituzione del tampone di stimolazione.
- Evitare la contaminazione degli allergeni durante la stimolazione delle cellule: gli aeroallergeni in laboratorio possono contaminare campioni di sangue aperti e sospensioni cellulari, provocando un incremento del segnale di sfondo. Campioni di sangue e provette di stimolazione cellulare devono essere accuratamente coperte con coperchi o pellicole. Evitare acari della polvere, pollini, guanti di lattice o attrezzature che potrebbero contenere lattice ed evitare finestre aperte nel laboratorio adibito alla stimolazione cellulare. Si consiglia di eseguire i passaggi di preparazione e stimolazione cellulare al di sotto di una cappa a flusso laminare.
- Il bagnomaria è preferibile rispetto a un incubatore in quanto offre una conduzione di calore più efficiente. Se si utilizza un incubatore, verificare che la temperatura sia 37°C. Temperature inferiori o superiori potrebbero incidere sui risultati.
- Per gli allergeni farmaci si prevede generalmente un basso livello di attivazione dei basofili. È pertanto cruciale

garantire il mantenimento di condizioni ottimali, tra cui la temperatura adeguata durante la stimolazione. Per gli allergeni farmaci si consiglia di utilizzare provette singole anziché piastre a deep well.

- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti di lotti diversi.
- Evitare la contaminazione dei reagenti.

Procedura del test

- Equilibrare il reagente di lisi a temperatura ambiente (18-28 °C).
- Prima di eseguire il test leggere attentamente le istruzioni. Le prestazioni del test risultano negativamente compromesse quando i reagenti vengono diluiti in modo scorretto, manipolati o conservati in condizioni diverse rispetto a quelle specificate nelle istruzioni per l'uso.
- Se i campioni vengono manipolati in modo scorretto si possono ottenere risultati inaccurati.
- Verificare visivamente le preparazioni per valutare l'efficacia del processo di lisi. Il processo di lisi degli eritrociti potrebbe essere incompleto e mostrare gli eritrociti su un dot plot di diffrazione ottica nella stessa posizione dei leucociti.
- Esporre le cellule a un processo di lisi prolungato potrebbe provocare perdita di cellule. Assicurarsi di avere almeno 300 basofili per ogni acquisizione dati. Consigliamo di completare l'acquisizione di campioni elaborati secondo il protocollo lyse-no-wash entro un'ora.
- La citometria a flusso potrebbe produrre risultati falsi in caso di: citometro non allineato, emissione fluorescente non adeguatamente compensata, gate delle regioni non posizionati con precisione.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

È consigliato che i pazienti evitino farmaci antiallergenici somministrati a livello sistemico quali corticosteroidi, acido cromoglicico (DSCG), per almeno 24 ore precedenti al prelievo di sangue.

Raccogliere il sangue in **provette per venipuntura K-EDTA** riempiendole fino a raggiungere l'apposito segno di volume. Le provette devono essere riempite almeno per metà. Un (1) mL di sangue intero è sufficiente per circa 18 provette di test.

Non centrifugare né congelare i campioni di sangue.

Sangue intero

I campioni di sangue intero conservati a 2-8 °C devono essere processati entro 48 ore dal prelievo.

Per la determinazione dei disturbi allergici da farmaci si consiglia di processare i campioni immediatamente e comunque non oltre 24 ore dal prelievo.

I campioni di sangue intero possono anche essere conservati a temperatura ambiente (fino a 28 °C). In tal caso devono tuttavia essere processati entro 24 ore dal prelievo seguendo il protocollo standard o entro lo stesso giorno del prelievo seguendo il protocollo lyse-no-wash.

Campioni processati

Le cellule processate secondo il protocollo standard sono fissate. Le cellule fissate possono essere conservate a 2-8 °C per 5 giorni al riparo dalla luce per la successiva acquisizione mediante citometria a flusso.

PROCEDURA DEL SAGGIO

1. Miscelare il campione di sangue anticoagulato invertendo ripetutamente la provetta per venipuntura.
2. Preparare delle nuove provette standard non pirogene in polipropilene o polistirene per citometria a flusso.
3. Etichettare le provette di ciascun paziente *ad es.* come segue:

PB = basale paziente (Patient Background)

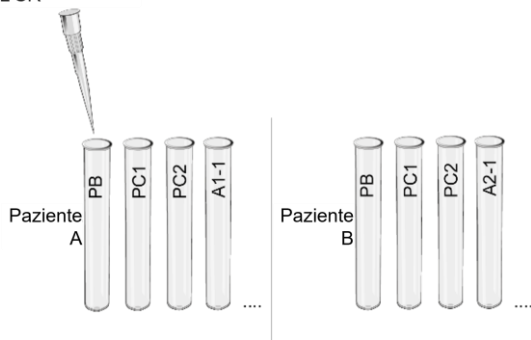
PC1 = controllo di stimolazione con anti-Fc ϵ RI Ab

PC2 = controllo di stimolazione con fMLP

A1-1 per allergene 1 con diluizione 1

A1-2 per allergene 1 con diluizione 2, ecc.

50 μ L stimolazione
100 μ L STB
50 μ L sangue
20 μ L SR



Stimolazione e colorazione

4. Aggiungere a ciascuna provetta 50 μ L dello stimolo corrispondente:
Provetta PB: 50 μ L di **tampone di stimolazione** (basale paziente)
Provetta PC1: 50 μ L di **controllo di stimolazione** con anticorpo monoclonale anti-Fc ϵ RI
Provetta PC2: 50 μ L di **controllo di stimolazione** fMLP
Provetta Ax-y: 50 μ L di **allergene**
5. Aggiungere 100 μ L di tampone di stimolazione (stimulation buffer, STB) a ciascuna provetta.
6. Aggiungere a ciascuna provetta 50 μ L di sangue intero del paziente. Assicurarsi che non ci sia sangue sui lati e sulla parte superiore della provetta.
7. Miscelare delicatamente.
8. Aggiungere a ciascuna provetta 20 μ L di reagente di colorazione (staining reagent, SR).
9. Miscelare delicatamente, coprire le provette e incubare per 15 minuti a 37°C a **bagnomaria**.

Nota: se si utilizza un incubatore anziché un bagnomaria, prolungare il tempo di incubazione a 25 minuti per bilanciare la ridotta efficienza nella conduzione del calore.

Lisi

Nota: il reagente di lisi deve essere equilibrato a temperatura ambiente (18-28 °C).

Protocollo standard: Lisi e lavaggio

10. Aggiungere a ciascuna provetta 2 mL di reagente di lisi equilibrato (18-28°C) e miscelare delicatamente.
11. Incubare per 5-10 minuti a 18-28°C.
12. Centrifugare le provette per 5 minuti a 500 x g.

13. Far decantare il surnatante usando carta assorbente.

14. Sospendere nuovamente il pellet cellulare con 300 μ L di tampone di lavaggio. Il tampone di lavaggio contiene un agente fissante.

Nota: la quantità di tampone di lavaggio può essere adattata alla specifica strumentazione di citometria a flusso utilizzata, osservando i requisiti di compatibilità del dispositivo in termini di volume morto e densità cellulare.

15. Vortexare delicatamente.

16a. Acquisire i campioni nel citometro a flusso.

OPPURE 16b. Se non acquisiti immediatamente, lasciar incubare i campioni per 30 min a temperatura ambiente e protetti dalla luce (fissaggio). Conservare i campioni sigillati e protetti dalla luce a 2-8°C fino alla misurazione. Le cellule fissate possono essere conservate a 2-8 °C per 5 giorni per successiva acquisizione mediante citometria a flusso. Vortexare delicatamente le provette di campione prima dell'acquisizione.

Nota: i campioni fissati conservati possono essere acquisiti in qualsiasi momento senza alcun trattamento preliminare. Per informazioni sui tempi di conservazione, consultare la sezione "Raccolta e conservazione dei campioni". Dopo periodi di conservazione più prolungati è possibile osservare una leggera riduzione dell'intensità di fluorescenza e un più basso recupero di basofili $\geq 80\%$.

Protocollo alternativo: Protocollo lyse-no-wash

I citometri a flusso ad alte prestazioni di nuova generazione sono in grado di analizzare campioni sottoposti a lisi senza lavaggio. Questa procedura deve essere adattata alla strumentazione di citometria a flusso utilizzata e potrebbe richiedere ottimizzazione. Il protocollo di seguito si basa sui dati acquisiti con un citometro a flusso Attune NxT (Thermo Fisher).

10. Seguire i passaggi da 1 a 9 della procedura analitica di cui sopra, quindi continuare con il passaggio 10. Aggiungere a ciascuna provetta 1.5 \pm 0.5 mL di reagente di lisi equilibrato (18-28°C) e miscelare delicatamente. Ottimizzare il volume a seconda della velocità di acquisizione di cui è in grado il citometro a flusso utilizzato.

11. Acquisire i campioni con un dispositivo per citometria a flusso high throughput usando un'elevata velocità di acquisizione in modo da ridurre al minimo il tempo di analisi.

Nota: i campioni devono essere analizzati entro 24 ore dal prelievo. Consultare la sezione "Raccolta e conservazione dei campioni".

ACQUISIZIONE DEI DATI DI CITOMETRIA A FLUSSO

L'acquisizione da citometria a flusso può essere eseguita su qualsiasi citometro a flusso che utilizza un diodo laser ad argon da 488 nm (luce di eccitazione blu-verde).

Il citometro a flusso deve essere in grado di rilevare canali di dispersione diretta (Forward Scatter, FSC), dispersione laterale (Side Scatter, SSC) e i due fluorocromi FITC e PE. Assicurarsi che il citometro a flusso sia correttamente allineato e che la compensazione del colore sia impostata. Per una corretta acquisizione e caratterizzazione dei basofili risposo e basofili attivati, creare i seguenti dot plot:

1. Creare il dot plot 1 come Forward Scatter vs Side Scatter (FSC/SSC) per acquisire l'intera popolazione di

leucociti come illustrato in Figura 1. Durante l'acquisizione dei campioni, assicurarsi che la popolazione di leucociti sia separata in tre popolazioni distinte (linfociti, monociti e granulociti) sul dot plot FSC/SSC. Regolare l'amplificazione (guadagno) dei segnali FSC e SSC in modo da ottenere una distribuzione analoga a quella illustrata in Figura 1. Consultare i manuali del citometro a flusso per istruzioni specifiche.

2. Creare il dot plot 2 come CCR3-PE vs Side Scatter come illustrato in Figura 2. Impostare un gate (es. basofili) che include l'intera popolazione di basofili come CCR3^{pos} e SSC^{low} come illustrato dal gate rettangolare in Figura 2. Gli eosinofili, che producono anch'essi segnale CCR3^{pos}, devono essere esclusi in base al segnale SSC alto.
3. Creare il dot plot 3 come CD63-FITC vs CCR3-PE mostrando solo il gate dei basofili, come illustrato in Figura 3. Usare i basofili non stimolati, resting, della provetta basale del paziente (PB) per impostare un quadrant gate che include le cellule basofili CD63 negative nel quadrante inferiore destro (CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{low}), come illustrato in Figura 3. I basofili attivati dalla stimolazione di controlli positivi e allergeni specifici risulteranno nella popolazione di basofili CD63 positivi (CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}) identificati nel quadrante superiore destro, come illustrato in Figura 4 con un esempio di stimolazione con controllo positivo (STCON).

Per ognuna delle provette di stimolazione, la lettura del test è espressa come rapporto tra basofili CD63 positivi e l'intera popolazione di basofili (% attivazione CD63), come identificato nel quadrant gate del dot plot 3.

ANALISI DEI DATI

I dati acquisiti sono analizzati mediante un adeguato software di analisi per citometria a flusso. Impostare dot plot i e gate come indicato per l'acquisizione.

I gate che identificano i basofili nel dot plot 2 possono essere indipendentemente adattati per qualsiasi differente stimolazione del campione di uno stesso paziente.

Per una corretta valutazione e standardizzazione dei risultati, si definisce un'impostazione per il background per ogni paziente utilizzando la stimolazione basale del paziente (PB). Il III quadrant gate del dot plot 3 deve essere sulla stimolazione basale PB. Per standardizzare l'analisi, il quadrant gate è impostato con una soglia tra 2 e 2.5% di basofili attivati nel campione di PB di ciascun paziente (vedere Figura 3).

Questo gate deve essere applicato a tutte le stimolazioni successive per lo stesso paziente (PC1, PC2 e tutti gli allergeni testati) per calcolare la percentuale di cellule CD63 positive in ogni stimolazione (vedere Figura 4).

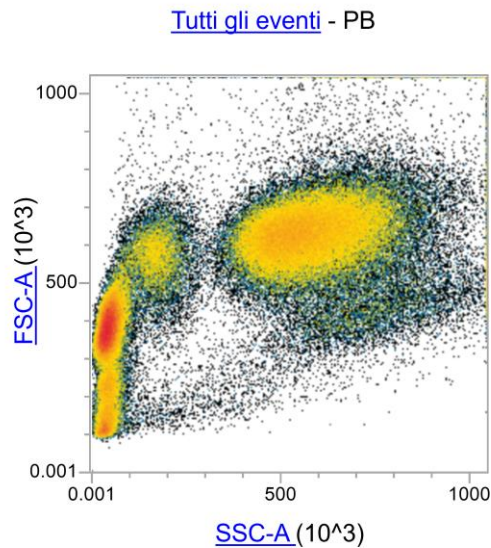


Figura 1: Tre popolazioni distinte (linfociti, monociti e granulociti) su un dot plot FSC/SSC.

Acquisire 500 o più basofili per ciascuna provetta di stimolazione (classificate come illustrato nel dot plot 2, Figura 2 di seguito). Se si acquisisce un numero di basofili inferiore a 300 (es. in caso di basopenia), non è possibile effettuare una valutazione dei risultati del test.

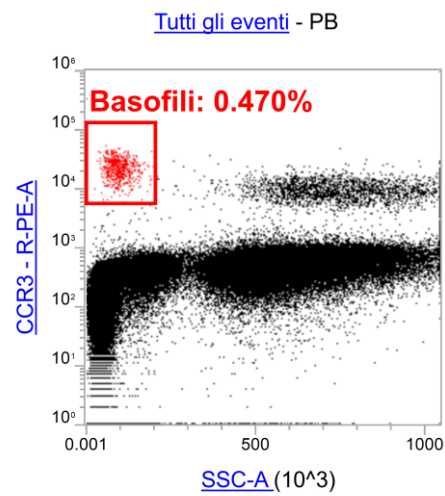


Figura 2: Selezione delle cellule basofili CCR3^{pos} / SSC^{low}

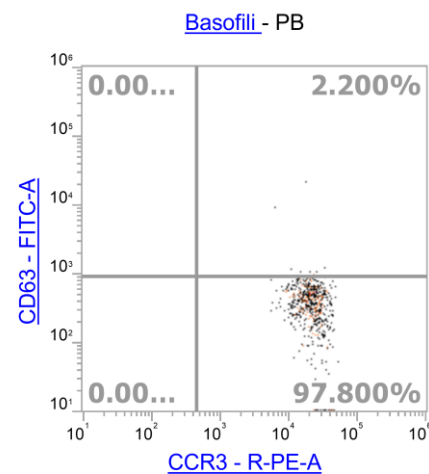
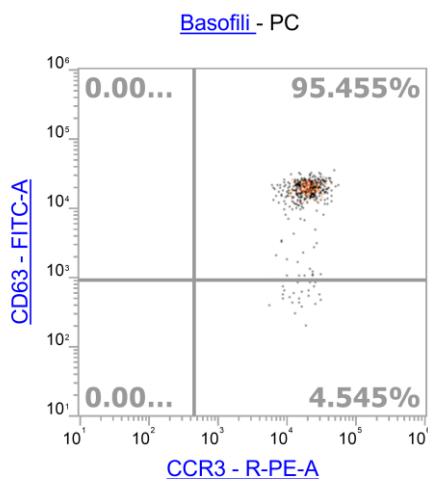


Figura 3: Sfondo paziente (PB) con solo STB

Regione classificata	Conteggio (n=)	%
Totale	125 864	100,0
Basofili	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{neg})	578	97,8



Regione classificata	Conteggio (n=)	%
Totale	130 926	100,0
Basofili	506	0,39
Q2 (CD63 _{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 _{neg})	23	4,5

Figura 4: Controllo di stimolazione (STCON)

CONTROLLO DI QUALITÀ

Per garantire risultati validi, osservare i criteri e le misure di controllo qualità descritti di seguito.

Popolazioni di leucociti: Tipicamente nel grafico FSC/SSC compaiono tre popolazioni distinte di leucociti: linfociti, monociti e granulociti (vedere Figura 1). Il loro rilevamento può essere considerato come criterio di qualità del campione di sangue (lasso di tempo tra prelievo del campione ed esecuzione dell'analisi, condizioni di conversazione). Se si acquisisce un numero di cellule basofile inferiore a 300 non è possibile effettuare una valutazione dei risultati del test.

Controlli di stimolazione (positivi) con mAb anti-FcεRI e fMLP: L'anticorpo monoclonale anti-FcεRI mima il legame dell'allergene al recettore *in vivo*. L'fMLP è un tripeptide che provoca l'attivazione dei basofili con un pathway 'non immunologico'.

- Il Campione è valutabile se il controllo con mAb anti-FcεRI induce una attivazione dei basofili $\geq 10\%$.
- Se a produrre un segnale $\geq 10\%$ è unicamente il controllo con fMLP ma non il controllo con mAb anti-FcεRI, il test è stato eseguito correttamente ma non è possibile valutare i risultati. Il paziente è considerato come IgE non-responder.
- Se entrambi i segnali con mAb anti-FcεRI e fMLP producono valori di basofili attivati $<10\%$, è probabile che si sia verificato un errore tecnico. I risultati del test devono essere considerati non validi ed è necessario ripetere il test.

STANDARDIZZAZIONE

Il test Flow CAST® rileva la popolazione di basofili che esprimono il marcatore di superficie cellulare CD63 come % della popolazione totale di basofili. Per questo analita non sono disponibili materiali di riferimento riconosciuti a livello nazionale o internazionale né procedure di riferimento per la sua misurazione.

La riproducibilità inter-lotto è garantita tramite titolazione di coniugati di anticorpi monoclonali anti-CD63-FITC e anti-

CCR3-PE contro beads di calibrazione. Per una stima della variabilità inter-lotto, consultare i risultati di riproducibilità nella sezione "Caratteristiche prestazionali".

LIMITAZIONI

- I risultati del test Flow CAST® devono essere interpretati congiuntamente ad altre evidenze cliniche e di laboratorio.
- Per determinare disturbi allergici relativi ai farmaci è necessario effettuare il test di attivazione dei basofili entro 6 mesi dalla comparsa della reazione allergica (rif. 8).
- Assicursi di effettuare il test di attivazione dei basofili almeno una o due settimane dopo il verificarsi di una reazione allergica (rif. 8).
- Un eventuale risultato negativo al test per farmaci non determina l'esclusione di allergie.
- Si stima che una percentuale tra il 5 e il 10% dei pazienti sia IgE non-responder. In questi pazienti non si osserverà alcuna upregolazione dell'espressione di CD63 con risultato positivo. I non responder possono essere identificati tramite controlli di stimolazione forniti con il test Flow CAST® test (rif. 9).
- Un prelievo insufficiente in provetta K-EDTA (riempimento inferiore alla metà) potrebbe comportare falsi negativi.
- Sono previste interferenze con i risultati del test Flow CAST® per i pazienti sottoposti a terapia omalizumab (XOLAIR®) (rif. 10).
- Evitare farmaci antiallergenici somministrati a livello sistemico quali corticosteroidi, acido cromoglicico (DSCG), per almeno 24 ore precedenti al prelievo di sangue.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del test Flow CAST® sono categorizzati come segue:

Risultati	Interpretazione
< cut-off	negativo
\geq cut-off per una o entrambe le diluizioni dell'allergene	positivo

Tabella 3

CUT-OFF E INTERVALLO DI RIFERIMENTO

È stato stabilito un valore di cut-off tecnico pari al 5% di basofili attivati, per cui un risultato $\geq 5\%$ CD63^{pos} indica attivazione dei basofili.

Per ciascun allergene una migliore specificità è ottenuta utilizzando i valori di cut-off specifici indicati negli BÜHLMANN Allergen Booklet.

Gli intervalli di riferimento sono stati stabiliti in base alle linee guida CLSI C28-A3. Centoventi (120) campioni di sangue provenienti da un centro di donazione sono stati stimolati con tampone di stimolazione o mAb anti-FcεRI e sottoposti a test secondo i protocolli standard e lyse-no-wash. I test sono stati eseguiti nel corso di 26 giorni da tre operatori utilizzando reagenti Flow CAST® provenienti da due lotti.

Controllo	Protocollo di analisi	Intervallo di riferimento (IC 90%) [% CD63 ^{pos}]	
		2,5° percentile	97,5° percentile
Tampone di stimolazione	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)
mAb anti-FcεRI	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)

Tabella 4

PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni cliniche del test Flow CAST® sono state valutate in una revisione sistematica della letteratura scientifica. Nell'analisi sono inclusi undici studi con revisione paritaria identificati mediante una ricerca sistematica della letteratura su un periodo fino a novembre 2019, uno studio sui veleni di insetti non identificato nella ricerca originale e due studi sugli allergeni delle arachidi pubblicati dopo il 2019. Gli studi indagano sulla capacità del test Flow CAST® di differenziare soggetti con disturbi allergici da quelli non allergici. I disturbi allergici nei soggetti allergici sono stati confermati da a) anamnesi clinica del paziente b) test di scatenamento per alimenti (Oral Food Challenge OFC) o test di provocazione c) anamnesi clinica e test di laboratorio (test di reazione cutanea, sIgE) oppure d) anamnesi clinica e OFC / test di provocazione, da soggetti non allergici. Gli studi che fanno utilizzo di sIgE o test di reazione cutanea come unico riferimento clinico sono stati esclusi. I risultati sono riassunti nella Tabella 5.

Gruppo allergico	N studi	Sensibilità valore mediano (range)	Soggetti allergici (totale)	Specificità valore mediano (range)	Soggetti di controllo (totale)
Alimenti	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Agenti inalanti					
Veleni di insetti					
Farmaci	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Tabella 5

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Precisione intra-laboratorio: CV ≤25% per stimolo

La ripetibilità (within-run) e la precisione intra-laboratorio sono state determinate in base alle linee guida EP05-A3 del CLSI e lo standard ISO 15197:2013. Quattro campioni di sangue donato sono stati stimolati con tampone di stimolazione o controllo di stimolazione con mAb anti-FcεRI. Per la procedura standard è stato applicato un disegno di studio a 2 operatori x 4 giorni x 1 analisi x 4 replicati. Per la procedura lyse-no-wash è stato applicato un disegno di studio a 2 operatori x 1 giorno x 4 analisi x 4 replicati. Un replicato consiste in una indipendente reazione di stimolazione e procedura di analisi completa. I risultati per il controllo di stimolazione con mAb anti-FcεRI sono riassunti nella Tabella 6.

Protocollo del test	Donatore	Valore medio [%CD63]	n	Nella singola analisi [CV%]	Tra giorni (A) Tra analisi (B) [CV%]	Totale [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%
lisi senza lavaggi (B) ₀	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%

Tabella 6

Riproducibilità: CV ≤25% per stimolo

La riproducibilità è stata determinata in base alle linee guida EP05-A3 del CLSI e lo standard ISO 15197:2013. Quattro campioni di sangue da donatori sono stati stimolati con tampone di stimolazione o controllo di stimolazione con mAb anti-FcεRI. I campioni sono stati analizzati in due diversi laboratori seguendo il protocollo standard. È stato applicato un disegno di studio a 3 strumenti/lotti x 2 operatori x 1 giorno x 5 replicati. Un replicato consiste in una reazione di stimolazione e procedura di analisi completa indipendenti. I risultati per il controllo di stimolazione con mAb anti-FcεRI sono riassunti nella Tabella 7.

Donatore	Valore medio [%CD63]	n	Nella singola analisi [CV%]	Tra operatori [CV%]	Tra lotti/strumenti [CV%]	Totale [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%

Tabella 7

SOSTANZE INTERFERENTI

La suscettibilità del test Flow CAST® ad agenti farmacologici, anomalie nelle condizioni del sangue e all'additivo per campioni K-EDTA è stata valutata secondo le linee guida EP07-A2 del CLSI. Bias eccedenti il 20% per controllo di stimolazione con mAb anti-FcεRI e il 20% CD63^{pos} (assoluto) per controllo di stimolazione fMLP sono stati considerati come interferenza nei risultati. Nessuna interferenza è stata rilevata alle concentrazioni definite con le sostanze elencate in Tabella 8 alle concentrazioni riportate. In un donatore è stata rilevata interferenza con K-EDTA a concentrazione doppia rispetto a quella nelle provette per venipuntura.

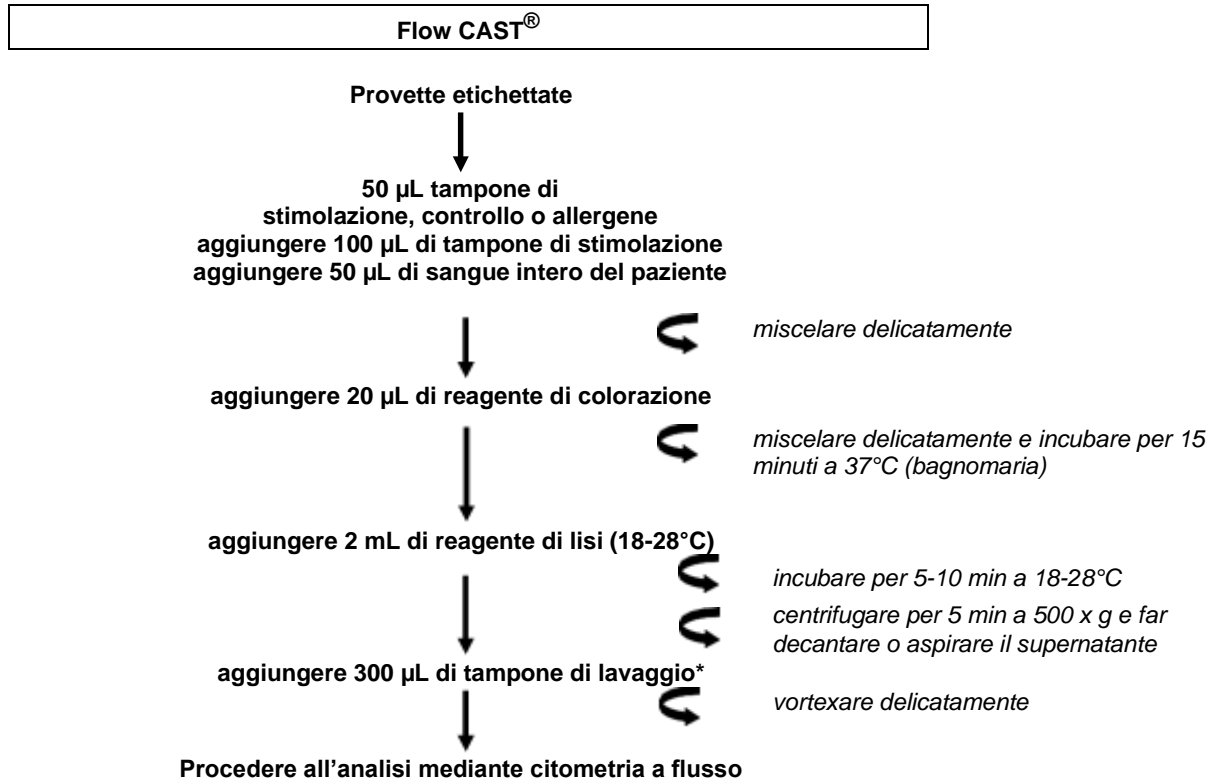
Principio attivo	Concentrazione di test [µg/mL]
Fexofenadine cloridrato	1,6
Cetirizina dicloridrato	4,35
Idrossizina dicloridrato	0,27
Ketotifene	0,6
Montelukast	3,84
Prednisone	1,2
N-acetil-L-triptofano	30
Trigliceridi (intraipidi)	20'000
Bilirubina coniugata	400
Bilirubina non coniugata	400
Emolisi	56'100

Tabella 8

RIFERIMENTI

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. Ugucioni, 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).

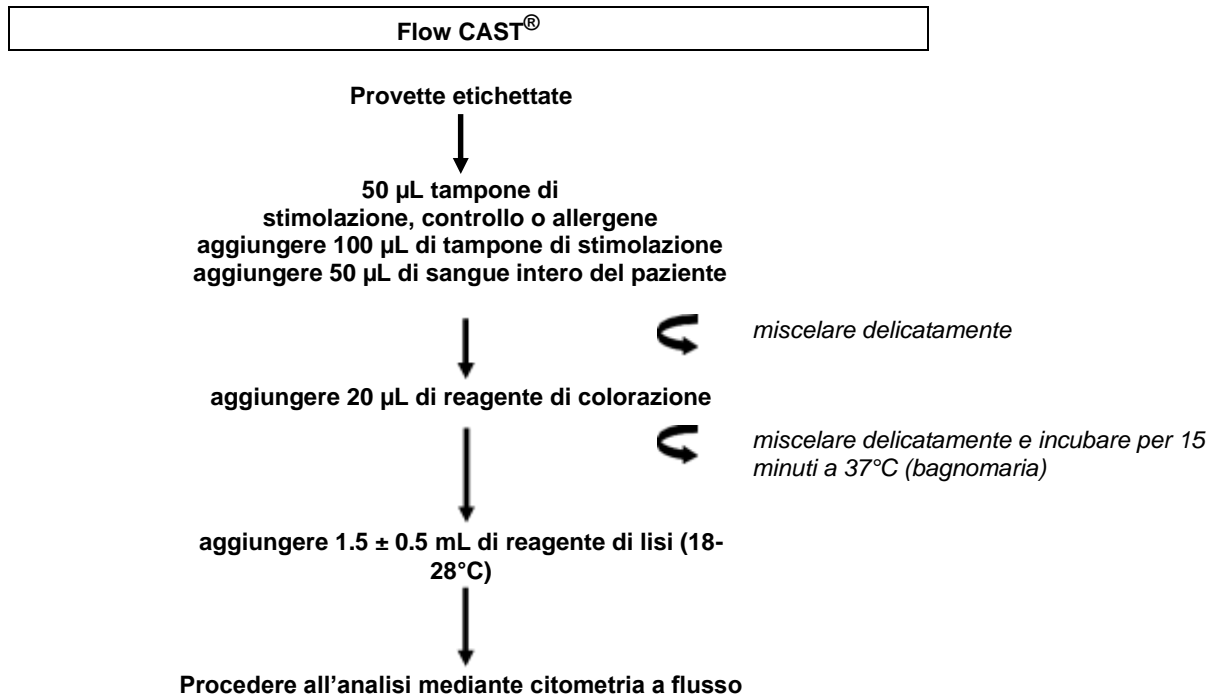
PROTOCOLLO STANDARD: LISI E LAVAGGIO



TEMPO ALL'ACQUISIZIONE ~30 MIN / TEMPO AL RISULTATO: ~ 1 ORA

* Nota: la quantità di tampone di lavaggio può essere adattata alla specifica strumentazione di citometria a flusso utilizzata, osservando i requisiti di compatibilità del dispositivo in termini di volume morto e densità cellulare.

PROTOCOLLO ALTERNATIVO: PROTOCOLLO LYSE-NO-WASH



TEMPO ALL'ACQUISIZIONE ~ 20 MIN/ TEMPO AL RISULTATO: ~ 1 ORA

CHANGELOG

Data	Versione	Modifica
2023-06-21	A2	Riformulazione nel capitolo <i>Analisi dei dati e Caratteristiche prestazioni</i> Aggiunta del numero di ente notificato al marchio CE – procedura di valutazione della conformità conformemente al Regolamento sui dispositivi diagnostici in vitro (IVDR) 2017/746

SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE

Si prega di segnalare immediatamente al produttore e alle autorità competenti del proprio paese eventuali incidenti gravi avvenuti in relazione all'uso di questo dispositivo.

DANNI DOVUTI ALLA SPEDIZIONE

Informare il proprio distributore se il prodotto è stato ricevuto danneggiato.

SIMBOLI

BÜHLMANN utilizza simboli e indicazioni elencati e descritti nella norma ISO 15223-1. Sono inoltre utilizzati i seguenti ulteriori simboli e segni:

Simbolo	Spiegazione
BUF STIM	Tampone di stimolazione
CONTROL STIM	Controllo di stimolazione
CONTROL FMLP	Controllo di stimolazione fMLP
REAG STAIN	Reagente colorante
REAG LYS	Reagente di lisi
BUF WASH	Tampone di lavaggio