



# Flow CAST®

Basofil aktiveringstest (BAT)  
Flowcytometri

Til *in vitro* diagnostisk bruk.

FK-CCR 100 tester

Utgivelsesdato: 2023-06-21  
Versjon A2

---

 **Produsent**

**BÜHLMANN Laboratories AG**  
Baselstrasse 55  
4124 Schönenbuch, Sveits  
Tlf.: +41 61 487 12 12  
Faks: +41 61 487 12 34  
info@buhlmannlabs.ch



## TILTENKT BRUK

BÜHLMANN Flow CAST® er en *in vitro* diagnostisk test for kvalitativ vurdering av basofil-aktivering ved stimulering med spesifikke allergener. Testen bruker flowcytometri for å bestemme basofilpopulasjonen som uttrykker CD63-celleoverflatemarkør i pasientens K-EDTA fullblodprøver. Flow CAST® er ment som et hjelpemiddel for diagnostisering av allergiske lidelser av akutt type i forbindelse med andre kliniske funn og laboratoriefunn. Kun til laboratoriebruk.

## ANALYSENS PRINSIPP

Flow CAST® er en flowcytometri-basert test av basofil-aktivering (ref. 1, 2). Fullblod fra pasienter stimuleres med spesifikke allergener, samt stimuleringsbuffer og stimuleringskontroller, for å evaluere pasientens basofile degranulering *ex vivo*. Prøven farges med to fluorescensmerkede monoklonale antistoffer: ett for basofil seleksjon (anti-CCR3-PE) og ett for bestemmelse av basofil aktiveringsstatus (anti-CD63-FITC) (ref. 3-6) CD63 er et transmembranprotein som finnes på intracellulære vesikler og kun presenteres på celleoverflaten etter basofil degranulering (ref. 7).

Erytrocytter fra pasientprøven fjernes ved en lyseringsreaksjon. Avhengig av protokollen blir cellene sentrifugert, resuspendert i vaskebuffer og fiksert for senere analyse ved flowcytometri eller de analyseres rett etter lysing. Basofiler sorteres ut fra leukocyt-populasjonen til CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>. Aktiveringsstatus til utsorterte basofiler bestemmes av deres CD63-ekspressjon (aktiveringsmarkør). Pasienter som ikke får IgE-mediert allergisk respons, såkalte ikke-responder, identifiseres basert på resultatene av de positive kontrollene. Avlesningen av analysen indikeres som forholdet mellom CD63-positive basofiler over alle basofile (% CD63-aktivering).

## MEDFØLGENDE REAGENSER OG KLARGJØRING

Reagenser	Mengde	Kode	Kommentarer
<b>Stimuleringsbuffer</b> som inneholder kalsium, heparin og IL-3	1 hetteglass lyofilisert	B-CCR-STB	Rekonstituer med 50 mL vann <sup>1)</sup>
<b>Stimuleringskontroll</b> anti-FcεRI mAb	1 hetteglass lyofilisert	B-CCR-STCON	Rekonstituer med 1,5 mL B-CCR-STB
<b>Stimuleringskontroll</b> fMLP <sup>2)</sup>	1 hetteglass lyofilisert	B-CCR-FMLP	Rekonstituer med 1,5 mL B-CCR-STB
<b>Reagens til farging</b> Blanding av anti-CD63-FITC og anti-CCR3-PE mAb	1 hetteglass 2,2 mL	B-CCR-SR	Klar til bruk
<b>Reagens til lysing</b> <sup>3)</sup> 10x konsentrert	1 hetteglass 25 mL	B-CCR-LYR	Fortynn med 225 mL med avionisert vann
<b>Vaskebuffer</b> med 0,1 % formaldehyd	1 hetteglass 100 mL	B-CCR-WB	Klar til bruk

Tabell 1

<sup>1)</sup> For nødvendig vannkvalitet, se kapittel Tekniske forholdsregler

<sup>2)</sup> N-formyl-metionyl-leucyl-fenylalanin

<sup>3)</sup> Krystaller kan dannes under lagring ved 2-8 °C og skal løses opp ved 18-28 °C før fortynning

## REAGENSENES HOLDBARHET OG OPPBEVARING

Uåpnede reagenser	
Oppbevares ved 2-8 °C. Ikke bruk reagensene etter utløpsdatoen som er trykt på etikettene.	
Åpnede reagenser og rekonstituerte reagenser	
Stimuleringsbuffer	Stabil ved -20 °C i 6 måneder. Alikvoter dersom gjentatt bruk forventes.
Stimuleringskontroll	
Stimuleringskontroll fMLP	
Lyseringsreagens	Stabil ved 2-8 °C i 6 måneder.
Reagenser til farging	
Vaskebuffer	

Tabell 2

## MATERIALER SOM ER NØDVENDIGE, MEN SOM IKKE FØLGER MED

- K-EDTA venipunktur-rør
- Sentrifuge
- Pyrogenfri polypropylen eller polystyren flowcytometri reagensrør til engangsbruk
- Flowcytometri reagensrørstativer for stimuleringen
- Vorteks-mikser
- (Valgfritt) mikrotiterplater av vevskulturkvalitet for cellestimulering og farging for standardprotokollen
- (Valgfritt) dybbrønnplater for cellestimulering, farging, lysing og flowcytometri-akvisisjon for lyse-no-wash-protokollen
- Presisjonspipetter med pyrogenfrie engangsspisser:
  - 10-100 µL, 100-1000 µL,
  - 1-5 mL justerbar pipette og
  - Valgfritt: 10-50 µL justerbar dispenser
- 50 mL sylinder for rekonstituering av stimuleringsbuffer
- Sterilt, ultrarent og apyrogen vann til rekonstituering av stimuleringsbufferen (se kapittelet Tekniske forholdsregler)
- Vannbad (anbefalt) eller inkubator satt til 37 °C
- Destillert eller avionisert vann samt passende laboratorieglass for fortynning av lyseringsreagens
- Lokk eller parafilm for å dekke rør under inkubasjonstrinn
- Dispensere på flaske for lyseringsreagens og vaskebuffer
- Flowcytometer utstyrt med en 488 nm (blå) laserkilde samt emisjonsfiltre for PE- og FITC-deteksjon
- Programvare for flowcytometrisk analyse (se kapittelet Flowcytometrisk dataakvisisjon)

## ALLERGENER SKAL BESTILLES SEPARAT

Allergener validert for Flow CAST® tilbys separat av BÜHLMANN. For bestillingskoder for allergener samt informasjon om allergenpreparater, se BÜHLMANNs allergen-brosjyrer på nettstedet til BÜHLMANN:

[www.buhlmannlabs.ch](http://www.buhlmannlabs.ch)

**Viktig:** Flow CAST® ble testet kun i kombinasjon med CAST®-allergener fra BÜHLMANN Laboratories AG. Det er laboratoriets eneansvar å validere bruken av allergener hentet fra andre kilder.

## FORHOLDSREGLER

### Forholdsregler for sikkerhet

- Stimuleringsbufferen (B-CCR-STB) i denne testen inneholder komponenter av human opprinnelse. Selv om de er testet og funnet negative for HBV overflateantigen, HCV og HIV1/2 antistoffer, skal reagensene håndteres som om de er i stand til å overføre infeksjoner og skal håndteres i samsvar med god laboratoriepraksis (GLP) ved bruk av korrekte forholdsregler.
- Unngå å få reagenser i kontakt med hud, øyne eller slimhinner. Hvis det oppstår kontakt, vask umiddelbart med store mengder vann.
- Reagenser og kjemikalier må behandles som farlig avfall i henhold til nasjonale sikkerhetsretningslinjer eller forskrifter for biologisk farlig avfall.

### Tekniske forholdsregler

- Anbefalt vannkvalitet for Flow CAST®: Bruken av sterilt, ultrarent og apyrogen vann for å rekonstituere stimuleringsbuffer (B-CCR-STB) er avgjørende for god og reproducerbar basofil-stimulering. Følgende vannkilder kan brukes: vann av cellekulturkvalitet, vann av infusjonskvalitet eller avionisert, dobbeltdestillert vann som er ultra-filtrert i et periodisk rensert 10 kDa ultrafilter.
- Lyseringsreagensen (B-CCR-LYR) kan rekonstitueres med avionisert, dobbeltdestillert vann eller samme vannkvalitet som brukes til rekonstituering av stimuleringsbufferen.
- Unngå allergenforurensning under cellestimulering: Aeroallergener i laboratoriet kan forurense åpne blodprøver og cellesuspensjoner, og forårsake forhøyet bakgrunnsverdi. Blodprøver og cellestimuleringsrør må dekkes nøye med lokk eller parafilm. Unngå husstøvmidd, pollinerende planter, latekshansker eller utstyr som potensielt inneholder lateks samt åpne vinduer i laboratoriet hvor cellestimuleringen utføres. Det anbefales å utføre celleforberedelsen og stimuleringstrinnene i et laminært luftstrømskap.
- Vannbad anbefales sammenlignet med en inkubator, på grunn av mer effektiv varmeoverføring. Hvis du bruker en inkubator, må du kontrollere at temperaturen er 37 °C. Lavere eller høyere temperaturer kan påvirke resultatene.
- Generelt forventes lavt nivå av basofil-aktivering for legemiddelallergener. Det er derfor avgjørende at man oppnår optimale forhold under stimulering, inkludert temperatur. Det anbefales å bruke enkeltrør i stedet for dyprørplater for legemiddelallergener.
- Komponenter skal ikke brukes etter utløpsdatoen som er trykt på etikettene.
- Ikke bland forskjellige partier av reagenser.
- Unngå kontaminering av reagenser.

### Testprosedyre

- Ekvilibrer lyseringsreagensen til romtemperatur (18-28 °C).
- Les instruksjonene grundig før testen gjennomføres. Testytelsen vil bli negativt påvirket hvis reagenser på feil måte fortynnes, håndteres eller oppbevares under andre forhold enn de som er beskrevet i denne bruksanvisningen.
- Prøver som ikke håndteres riktig kan føre til unøyaktige resultater.

- Verifiser preparatene visuelt for å vurdere effekten av lyse. Erytrocyttene kan være ufullstendig lysert og vises på et lysdiffraksjonspunktplott på samme sted som leukocyttene.
- Forlenget lyseringstid kan føre til celletap. Sørg for at du har minst 300 basofiler for dataakvisisjon. Vi anbefaler at akvisisjon av prøver behandlet med lyse-no-wash-protokollen utføres innen en time.
- Flowcytometri kan gi falske resultater dersom: cytometeret er feiljustert, fluorescensemisjonen ikke er riktig kompensert, gating-områdene ikke er nøyaktig plassert.

## PRØVETAKING OG OPPBEVARING AV PRØVE

Det anbefales at pasienter unngår systemisk administrerte anti-allergene legemidler som kortikosteroider, kromoglysyne (DSCG) i minst 24 timer før blodprøvetaking.

Samle blodet i **K-EDTA venipunktur-rør** ved å fylle rørene opp til angitt volummerke. Rørene må fylles minst halvfulle. Én (1) mL fullblod er tilstrekkelig til omtrent 18 testrør.

**Ikke sentrifuger eller frys blodprøver.**

### Fullblod

Fullblodsprøver lagret ved 2–8 °C skal behandles innen 48 timer etter prøvetaking.

For bestemmelse av allergiske lidelser mot legemidler anbefales det å behandle prøver umiddelbart og senest 24 timer etter prøvetaking.

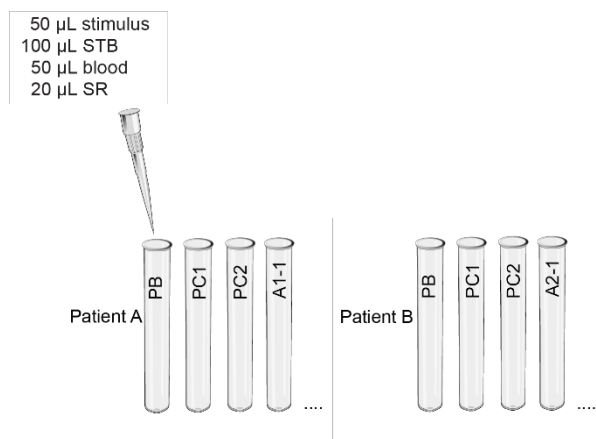
Fullblodsprøver kan også oppbevares i romtemperatur (temperaturer opp til 28 °C). De må imidlertid behandles innen 24 timer etter prøvetakingsdagen ved bruk av standardprotokollen eller på prøvetakingsdagen ved bruk av lyse-no-wash-protokollen.

### Prosesserte prøver

Celler behandlet ved hjelp av standardprotokollen fikseres. Fikserte celler kan oppbevares ved 2-8 °C i 5 dager beskyttet fra lys for påfølgende akvisisjon ved flowcytometri.

## ANALYSEPROSEDYRE

1. Miks den anti-koagulerende blodprøven ved å snu på venipunktur-røret flere ganger.
2. Klargjør ferske og pyrogenfrie standard flowcytometrør av polypropylen eller polystyren.
3. For enhver pasient skal rørene merkes med *f.eks.* følgende:
  - PB = pasientens bakgrunnsverdi
  - PC1 = stimuleringskontroll med anti-FcεRI Ab
  - PC2 = stimuleringskontroll med fMLP
  - A1-1 for allergen 1 med fortykning 1
  - A1-2 for allergen 1 med fortykning 3 osv.



## Stimulering og farging

- Tilsett 50 µL av den korresponderende stimulansen til hvert rør:
  - PB rør: 50 µL **stimuleringsbuffer** (pasientens bakgrunnsverdi)
  - PC1 rør: 50 µL **stimuleringskontroll** anti-FcεRI mAb
  - PC2 rør: 50 µL **stimuleringskontroll** fMLP
  - Ax-y rør: 50 µL **allergen**
- Tilsett 100 µL av stimuleringsbuffer (STB) til hvert rør.
- Tilsett 50 µL av pasientens fullblod til hvert rør. Pass på at siden og toppen av røret er fritt for blod.
- Bland forsiktig.
- Tilsett 20 µL fargereagens (SR) til hvert rør.
- Bland forsiktig, dekk til rørene og inkuber i 15 minutter ved 37 °C i et **vannbad**.

**Merk:** Hvis det brukes inkubator, i stedet for vannbad forlenges inkubasjonstiden til 25 minutter på grunn av mindre effektiv varmeoverføring.

## Lysering

**Merk:** Lyseringsreagensen må ekvilibrerer til romtemperatur (18-28 °C).

## Standardprotokoll: Lyser og vask

- Tilsett 2 mL ekvilibrert (18–28 °C) lyseringsreagens til hvert rør, bland forsiktig.
- Inkuber i 5-10 minutter ved 18-28 °C.
- Sentrifuger rørene i 5 minutter ved 500 x g.
- Dekanter supernatanten ved å bruke trekkpappir.
- Resuspender cellepelletten med 300 µL vaskebuffer (et fikseringsmiddel er inkludert i vaskebufferen).

**Merk:** Mengden vaskebuffer kan tilpasses den spesifikke flowcytometer-instrumenteringen som brukes, i henhold til dødvolumet og celletettheten som er kompatibel med enheten.

- Vortekser forsiktig.

**Enten** 16a.innhente prøvene på flowcytometeret.

**Eller** 16b.hvis ikke innhentet umiddelbart, la prøvene inkuberes i 30 minutter ved RT og beskyttet mot lys (fiksering). Oppbevar prøvene forsegle og beskyttet mot lys ved 2-8 °C frem til måling. Fikserte celler kan oppbevares ved 2-8 °C i 5 dager for påfølgende akvisisjon ved flowcytometri. Vortekser forsiktig prøverørene før akvisisjon.

**Merk:** Det kan til enhver tid utføres akvisisjon av oppbevarte fikserte prøver uten forbehandling. Se avsnittet

«Prøvetaking og oppbevaring» for oppbevaringstider. En liten reduksjon i fluorescensintensitet og en lavere basofilgjenvinning  $\geq 80\%$  kan observeres etter lengre lagring.

## Alternativ protokoll: Lyse-no-wash-protokoll

Ny generasjons, høytytelses flowcytometre kan analysere lyserte, uvaskede prøver. Denne prosedyren må tilpasses flowcytometer-instrumenteringen som brukes og kan kreve optimalisering. Protokollen nedenfor er basert på data akvisert med en Attune NxT flowcytometer (Thermo Fisher).

- Utfør analyseprosedyre trinn 1 til 9 (over), og fortsett deretter med trinn 10 her. Tilsett  $1,5 \pm 0,5$  mL ekvibrert (18-28 °C) lyseringsreagens til hvert rør, bland forsiktig (volumet må optimaliseres avhengig av akvisisjonshastighetskapasiteten til flowcytometeret som brukes).
- Akviser prøvene ved å bruke en egnet flowcytometerenhet med høy gjennomstrømning ved høy akvisisjonshastighet for å holde analys tiden til et minimum.

**Merk:** Prøver bør analyseres innen 24 timer etter mottak av prøven. Se avsnittet «Prøvetaking og oppbevaring».

## FLOWCYTOMETRISK DATAAKVISISJON

Flowcytometrisk akvisisjon kan utføres på et hvilket som helst flowcytometer som arbeider med en 488 nm argonlaserdiode (blågrønt eksitasjonslys).

Flowcytometeret må være utstyrt for å oppdage Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) og de to fluorokromene FITC- og PE-kanalene.

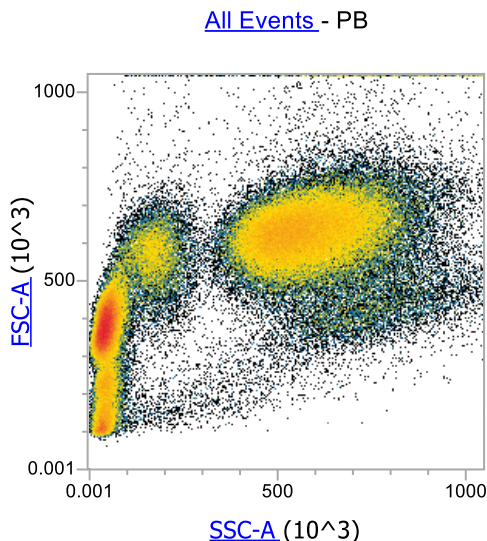
Sørg for at flowcytometeret er riktig justert, og at fargekompensasjonen er stilt inn.

For riktig akvisisjon og karakterisering av hvilende og aktiverte basofiler, opprett følgende punktplott:

- Lag punktplott 1, som Forward Scatter vs Side Scatter for å skaffe hele leukocyttopulasjonen som vist i figur 1. Under akvisisjon av prøvene, sørg for at leukocyttopulasjonen er atskilt i tre diskrete populasjoner (lymfocytter, monocytter og granulocytter) på FSC/SSC-punktplottet. Juster amplifisering (forsterkning) av FSC- og SSC-signaler for å oppnå en distribusjon som vist i figur 1. Se produktmanualen for flowcytometeret for instruksjoner.
- Opprett punktplott 2, som CCR3-PE vs Side Scatter som vist i figur 2. Sett en gate (f.eks. basofiler) inkludert hele basofilpopulasjonen som CCR3<sup>pos</sup> og SSC<sup>low</sup> som vist med rektangelgaten i figur 2. Eosinofiler, som også er CCR3<sup>pos</sup>, må utelukkes basert på høy SSC.
- Opprett punktplott 3, som CD63-FITC vs CCR3-PE, og viser bare de gatede basofile, som vist i figur 3. Bruk de ikke-stimulerte, hvilende basofilene fra pasientbakgrunnsrøret (PB) til å sette en kvadrantport inkludert CD63 negative basofile celler i nedre høyre kvadrant (CD63<sup>neg</sup> CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>) som vist i figur 3. Basofiler aktivert ved stimulering av positive kontroller og spesifikke allergener vil resultere i CD63-positiv basofilpopulasjon (CD63<sup>pos</sup>/CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>) identifisert i øvre høyre kvadrant, som vist i figur 4 med et eksempel på positiv kontrollstimulering (STCON).

Avlesningen av analysen indikeres som forholdet mellom CD63-positiv basofiler over alle basofiler (% Cd63-

aktivering) som identifisert i kvadrantporten til punktplott 3 for et hvilket som helst av stimuleringsrørene.



Figur 1: Tre diskrete populasjoner (lymfocytter, monocytter og granulocytter) på et FSC/SSC-punktplott.

Akviser 500 eller flere basofile celler for eventuelle stimuleringsrør (gatede som vist i punktplott 2, figur 2 nedenfor). Ved akvisisjon av mindre enn 300 basofile celler (f.eks. ved basopeni), kan testresultater ikke evalueres.

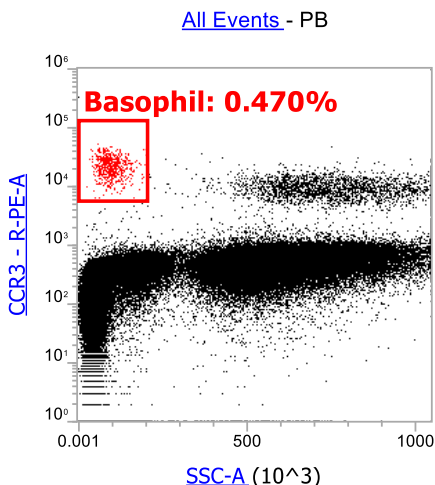
## DATAANALYSE

Akvisisjonsdata analyseres med passende programvare for flowcytometrianalyse. Sett lignende punktplott og porter som gjort for akvisisjonen.

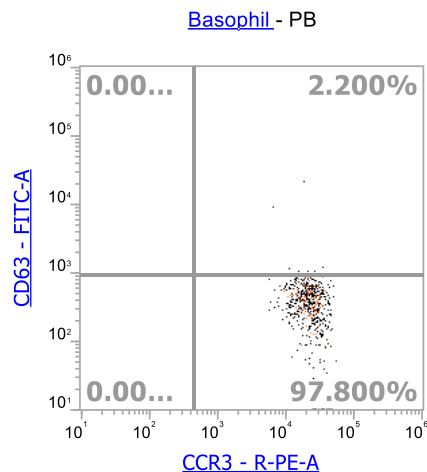
Portene som identifiserer basofiler i punktplott 2 kan tilpasses uavhengig i alle de forskjellige stimuleringene for samme pasientprøve.

For riktig evaluering og standardisering av resultatene defineres en bakgrunnsinnstilling for hver enkelt pasient ved å bruke pasientens bakgrunnsstimulering (PB). Kvadrantporten på punktplott 3 må defineres på PB. For å standardisere analysen er porten satt til å være mellom 2 og 2,5% aktiverte basofiler i Pb-prøven til hver pasient (se figur 3).

Denne porten må brukes på alle påfølgende stimuleringer for de samme pasientene (PC1, PC2 og alle målte allergener) for å beregne prosentandelen av CD63-positive celler i enhver stimulering (se figur 4).

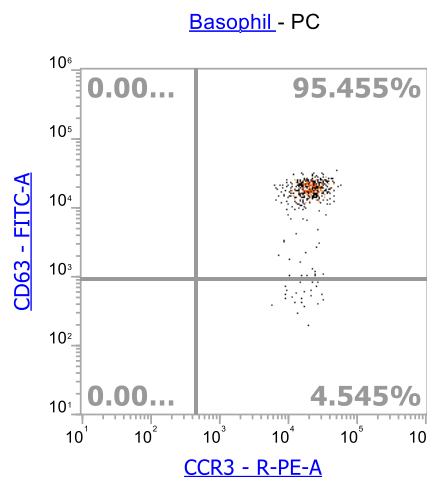


Figur 2: Utvalg av basofile celler CCR3<sup>POS</sup> / SSC<sup>LOW</sup>



Gated region	Antall (n=)	%
Totalt	125 864	100,0
Basofil	591	0,47
Q2 (CD63 <sup>pos</sup> )	13	2,2
Q4 (CD63 <sup>neg</sup> )	578	97,8

Figur 3: Pasientbakgrunn (PB) med kun STB



Gated region	Antall (n=)	%
Totalt	130 926	100,0
Basofil	506	0,39
Q2 (CD63 <sup>pos</sup> )	483	95,5
Q4 (CD63 <sup>neg</sup> )	23	4,5

Figur 4: Stimuleringskontroll (STCON)

## KVALITETSKONTROLL

Følgende kriterier og kvalitetskontrolltiltak skal oppfylles for et gyldig resultat:

**Leukocyttopopulasjoner:** Vanligvis skal tre distinkte leukocyttopopulasjoner lymfocytter, monocytter og granulocytter vises i FSC/SSC-plottet (se figur 1). Forekomsten av disse kan betraktes som et kriterium for kvaliteten på blodprøven (tids rammen mellom prøvetaking og analyseutførelse, lagringsforhold). Testresultater kan ikke evalueres ved akvisisjon av mindre enn 300 basofiler.

**Stimuleringskontroller (positive) anti-FcεRI mAb and fMLP:** Anti-FcεRI mAb etterligner brodannelsen av reseptoren forårsaket av allergenet *in vivo*. fMLP er et tripeptid som forårsaker basofil aktivering på en ikke-immunologisk måte.

- Dersom Anti-FcεRI mAb kontrollen viser verdier på ≥ 10% aktiverte basofiler, kan prøvene evalueres.
- Hvis bare fMLP-kontrollen viser et signal ≥ 10%, men ikke Anti-FcεRI mAb, er analysen korrekt utført, men testresultatene kan ikke evalueres. Pasienten regnes som en IgE-non-responder.
- Dersom både Anti-FcεRI mAb og fMLP viser verdier < 10% aktiverte basofiler er det sannsynlig at det er en teknisk feil. Testresultatet skal anses som ugyldig og testen skal gjentas.

## STANDARDISERING

Flow CAST® påviser populasjonen av basofiler som uttrykker CD63-celleoverflatemarkøren som % av totale basofiler. Det finnes ingen internasjonalt eller nasjonalt anerkjent referansemateriale eller referansemålingsprosedyrer for denne analytten. Batch-til-batch-reproduserbarhet er garantert ved titrering av anti-CD63-FITC og anti-CCR3-PE monoklonale antistoffkonjugater mot kalibreringskuler. For et estimat av batch-til-batch-variasjon, se reproduserbarhetsresultatene i avsnittet «Ytelsesegenskaper».

## BEGRENSNINGER

- Flow CAST® testresultater skal tolkes i sammenheng med andre kliniske funn og laboratoriefunn.
- For å fastslå legemiddelrelaterte allergiske lidelser skal BAT-testing utføres innen 6 måneder etter den allergiske reaksjonen (ref. 8).
- Sørg for at det har gått minst en til to uker etter en allergisk reaksjon før du utfører BAT-testing (ref. 8).
- Negative resultater oppnådd for medikamentallergener skal ikke brukes til allergieksklusjon.
- Det forventes at 5 til 10% av pasientene vil være IgE-ikke-responderere. For disse pasientene vil det ikke ses oppregulering av CD63-ekspresjon og et positivt resultat. Ikke-responderere kan identifiseres ved hjelp av stimuleringskontroller som følger med Flow CAST® test (ref. 9).
- Utilstrekkelig fylte K-EDTA-rør (mindre enn halvfylte) kan føre til falskt negative resultater.
- Det forventes forstyrrelse av Flow CAST® testresultater for pasienter som behandles med omalizumab (XOLAIR®) (ref. 10).
- Systemisk administrerte antiallergene legemidler som kortikosteroider, kromoglysyne (DSCG) skal unngås i minst 24 timer før blodprøvetaking.

## TOLKNING AV RESULTATER

Flow CAST® resultat kategorier er som følger:

Resultat	Tolkning
< cut-off	negativ
≥ cut-off for en eller begge fortynninger av allergenet.	positiv

Tabell 3

## CUT-OFF OG REFERANSEINTERVALL

En teknisk cut-off på 5% aktiverte basofiler er etablert, hvor resultater ≥ 5% CD63<sup>POS</sup> indikerer basofil aktivering.

For hvert allergen oppnås forbedret spesifisitet ved å bruke de allergenspesifikke cut-offs som angitt i BÜHLMANN Allergen brosjyrer.

Referanseintervaller ble fastsatt iht CLSI C28-A3. Ett hundre og tjue (120) blodprøver fra et bloddonasjonssenter ble stimulert med stimuleringsbuffer eller Anti-FcεRI mAb og testet i henhold til standard og lyse-no-wash-protokoller. Testing ble utført i løpet av 26 dager av tre operatører med to Flow CAST® reagenslots.

Kontroll	Analyse Protokoll	Referanseintervall (90 % KI) [% CD63 <sup>POS</sup> ]	
		2,5. persentil	97,5. persentil
Stimulering sbuffer	standard	0,8 (0,5 - 1,2)	4,6 (4,1 - 6,4)
	lyse-no-wash	0,9 (0,6 - 1,0)	4,2 (3,9 - 5,3)
Anti-FcεRI mAb	standard	18,0 (11,5 - 26,0)	97,7 (96,0 - 98,5)
	lyse-no-wash	13,2 (11,4 - 21,2)	96,4 (94,3 - 97,3)

Tabell 4

## KLINISK YTELSE

Klinisk ytelse av Flow CAST® ble evaluert i en systematisk vitenskapelig litteraturgjennomgang. Elleve fagfelleverderte studier identifisert i et systematisk litteratursøk som dekker en tidsperiode frem til november 2019, en studie på insektgift som ikke ble identifisert i det opprinnelige søket og to studier på peanøttallergener publisert etter 2019 ble inkludert i analysen. Studiene undersøkte Flow CAST® sin evne til å skille mellom personer med allergiske lidelser og ikke-allergiske personer. Allergiske lidelser hos den allergiske personen har blitt bekreftet av enten a) pasientens kliniske historikk, b) oral matprovokasjon (OFC) eller provokasjonstest, c) klinisk historikk og laboratorietesting (prikktest - SPT, slgE) eller d) klinisk historikk og OFC/provokasjonstest. Studier med bruk av slgE eller SPT som eneste kliniske referanse ble ekskludert. Resultatene er oppsummert i tabell 5.

Allergengruppe	N studier	Sensitivitet median (område)	Allergiske pasienter (totalt)	Spesifisitet median (område)	Kontrollpersoner (totalt)
Næringsmidler Inhalanter	5	92 % (81- 100 %)	311	93 % (80- 100 %)	240
Insektgift	2	87 % (73- 89 %)	79	96 % (95- 97 %)	39
Legemidler	7	55 % (0- 68 %)	227	91 % (79- 100 %)	167

Tabell 5

## YTELSESKARAKTERISTIKKER

### Presisjon innen laboratoriet: ≤ 25% CV for stimulus

Repererbarhet (innenfor kjøring) og presisjon innen laboratoriet ble etablert basert på CLSI-retningslinjen EP05-A3 og ISO standard 15197:2013. Fire donorblodprøver ble stimulert med stimuleringsbuffer eller stimuleringskontroll anti-FcεRI mAb. For standardprosedyren ble det benyttet et studiedesign med 2 operatører x 4 dager x 1 kjøring x 4 replikater. For lyse-no-wash ble det benyttet et studiedesign med



2 operatører x 1 dag x 4 kjøring x 4 replikater. Et replikat tilsvarer en uavhengig stimuleringsreaksjon og en full analyseprosedyre. Resultatene for stimuleringskontroll anti-FcεRI mAb er oppsummert i tabell 6.

Analyseprotokoll	Donor	Gjennomsnitt [%CD63]	n	Innen kjøring [%CV]	Mellom dager (A) Mellom kjøring (B) [%CV]	Totalt [%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 %

Tabell 6

### Reproduserbarhet: ≤ 25% CV for stimulus

Reproduserbarhet ble etablert basert på CLSI-retningslinje EP05-A3 og ISO-standard 15197:2013. Fire donorblodprøver ble stimulert med stimuleringsbuffer eller stimuleringskontroll anti-FcεRI mAb. Prøver ble analysert på to laboratoriesteder i henhold til standardprotokollen. Det ble benyttet et studiedesign med 3 instrumenter/lots x 2 operatører x 1 dag x 5 replikater. Et replikat tilsvarer en uavhengig stimuleringsreaksjon og en full analyseprosedyre. Resultatene for stimuleringskontroll anti-FcεRI mAb er oppsummert i tabell 7.

Donor	Gjennomsnitt [%CD63]	n	Innen kjøring [%CV]	Mellom operatører [%CV]	Mellom lot/instrumenter [%CV]	Totalt [%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%

Tabell 7

## INTERFERERENDE STOFFER

Flow CAST®-analysen sin susceptibilitet for legemidler, abnormale blodforhold og K-EDTA prøveadditiv ble vurdert i henhold til CLSI-retningslinje EP07-A2. Bias i resultater som overstiger 20% for stimuleringskontroll anti-FcεRI mAb og 20% CD63<sup>POS</sup> (absolutt) for stimuleringskontroll fMLP ble ansett som interferens. Det ble ikke påvist interferenser ved de oppgitte konsentrasjonene med stoffene oppført i tabell 8 ved konsentrasjonene på listen. Det ble oppdaget interferens med K-EDTA ved dobbel K-EDTA venepunkturrør-konsentrasjon for én donor.

Aktiv komponent	Testkonsentrasjon [µg/mL]
Fexofenadin hydroklorid	1,6
Cetirizindihydroklorid	4,35
Hydroksyzin-dihydroklorid	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednison	1,2
N-Acetyl-L-tryptofan	30
Triglycerid (Intralipid)	20'000
Konjugert bilirubin	400
Ukonjugert bilirubin	400
Hemolyse	56'100

Tabell 8



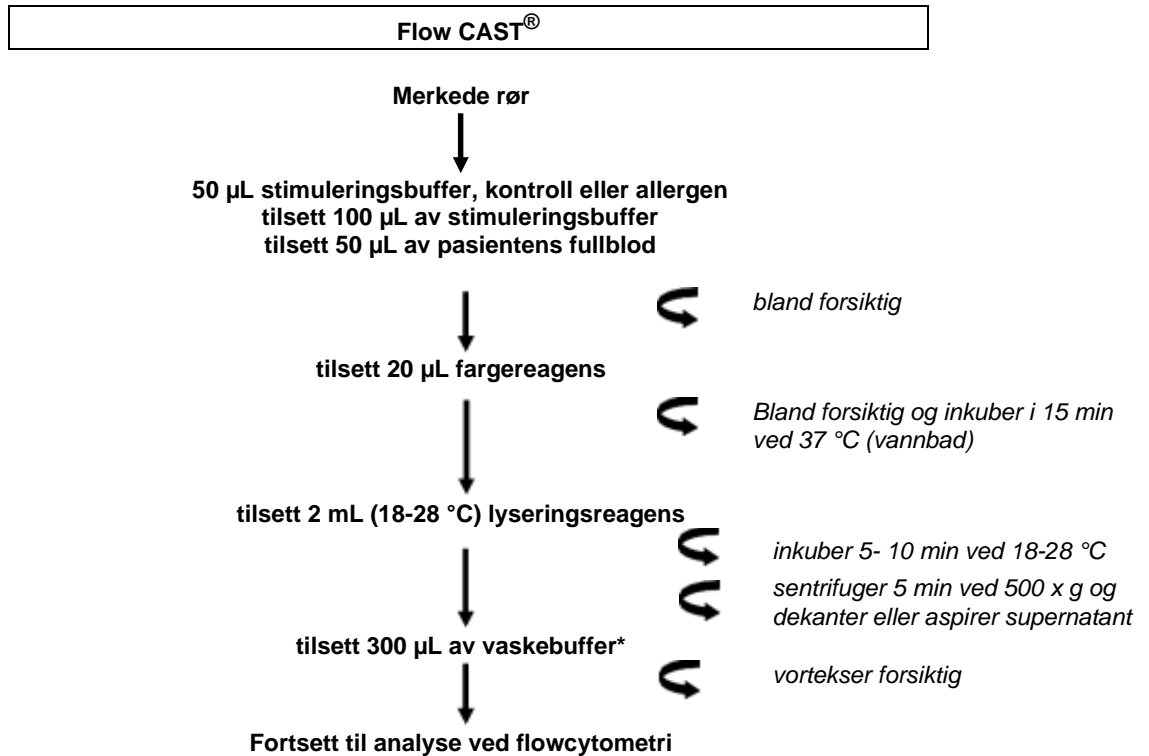
---

## REFERANSER

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).

## KORTE PROTOKOLLER

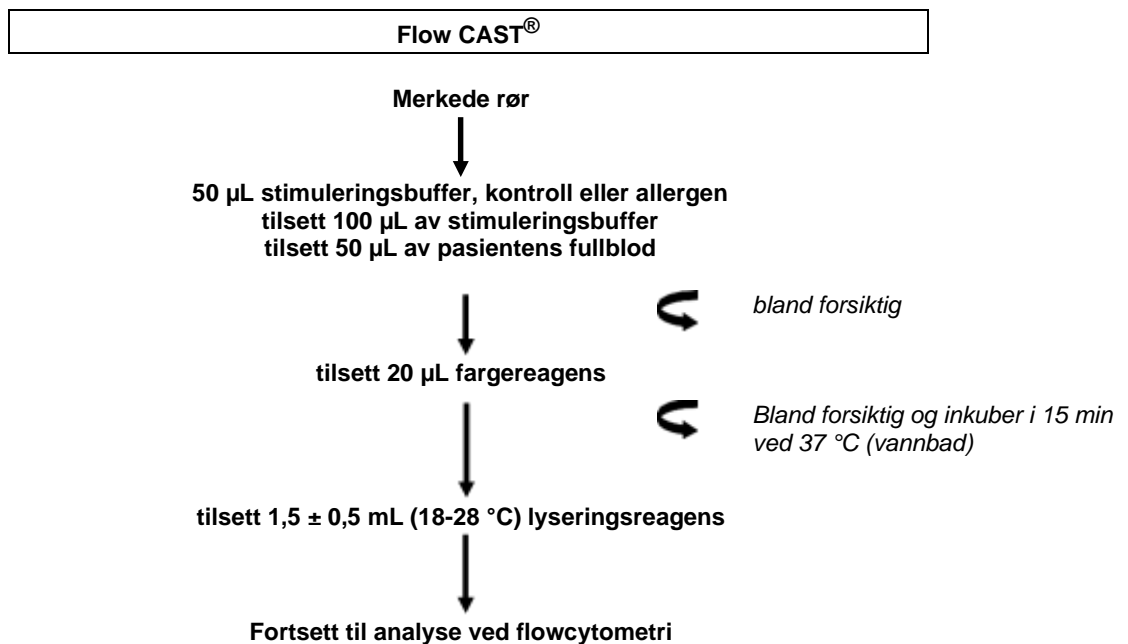
### STANDARDPROTOKOLL: LYSER OG VASK



TID TIL AKVISISJON ~30 MIN / TID TIL RESULTAT: ~ 1 TIME

\* Merk: Avhengig av flowcytometer-instrumenteringen som brukes, skal mengden vaskebuffer tilpasses med hensyn til dødvolum og celledensitet som er kompatibel med instrumentet.

### ALTERNATIV PROTOKOLL: LYSE-NO-WASH-PROTOKOLL



TID TIL AKVISISJON ~ 20 MIN / TID TIL RESULTAT: ~ 1 TIME

---

## ENDRINGSLOGG

Dato	Versjon	Endring
2023-06-21	A2	Omformulering i kapitlene <i>Dataanalyse</i> og <i>Klinisk ytelse</i> Inkludering av meldingsorgannummer til CE-merket – samsvarsvurderingsprosedyre iht IVDR 2017/746

---

## HENDELSESRAPPORTERING I EU-MEDLEMSSTATER

Dersom det har oppstått en alvorlig hendelse i tilknytning til denne enheten, skal den straks rapporteres til produsenten og kompetent myndighet i ditt medlemsland.

---

## SKADE UNDER FRAKT

Vennligst meld fra til din distributør, dersom dette produkt ble mottatt i skadet stand.

## SYMBOLER

BÜHLMANN bruker symboler og skilt som er oppført og beskrevet i ISO 15223-1. I tillegg brukes følgende symboler og tegn:

Symbol	Forklaring
BUF   STIM	Stimuleringsbuffer
KONTROLL   STIM	Stimuleringskontroll
KONTROLL   FMLP	Stimuleringskontroll fMLP
REAG   FARGING	Reagenser til farging
REAG   LYS	Lyseringsreagens
BUF   VASK	Vaskebuffer

