



Flow CAST[®]

Teste de ativação de basófilos (TAB)
Citometria de fluxo

Para uso em diagnósticos *in vitro*

FK-CCR 100 testes

Data de lançamento: 2023-06-21
Versão A2

 Fabricante

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

USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN Flow CAST® é um teste diagnóstico *in vitro* para a avaliação qualitativa da ativação de basófilos mediante estímulo com alérgenos específicos. O teste emprega citometria de fluxo para determinar a população de basófilos que expressam marcador de superfície celular CD63 em amostras de sangue total com K-EDTA dos pacientes. O Flow CAST® foi desenvolvido para ser auxiliar no diagnóstico de distúrbios alérgicos imediatos em conjunto com outros resultados clínicos e laboratoriais. Somente para uso laboratorial.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Flow CAST® é um teste de ativação de basófilos baseado em citometria de fluxo (ref. 1, 2). O sangue total dos pacientes é estimulado com alérgenos específicos e também com um tampão de estimulação e controles de estimulação, para avaliar a desgranulação de basófilos do paciente *ex vivo*. A amostra é colorida usando anticorpos monoclonais com marcação fluorescente: um para a seleção de basófilos (anti-CCR3-PE) e um para a determinação do status da ativação dos basófilos (anti-CD63-FICT) (ref. 3-6) CD63 é uma proteína transmembrana presente nos vesículos intracelulares e apresentadas na superfície celular apenas depois da desgranulação dos basófilos (ref. 7).

Os eritrócitos da amostra do paciente são removidos por uma reação lisante. Dependendo do protocolo, as células são centrifugadas, ressuspendidas em tampão de lavagem e fixadas para análise posterior por citometria de fluxo ou analisadas diretamente após a lise. Os basófilos são agrupados na população de leucócitos sob CCR3^{pos}/SSC^{low}. O status de ativação dos basófilos agrupados é determinado pela expressão de CD63 (marcador de ativação) deles. Os pacientes que não apresentam respostas alérgicas mediadas por IgE, chamados de não responsivos, são identificados com base nos resultados dos controles positivos. A leitura do ensaio é indicada como a razão de basófilos positivos para CD63 por todos os basófilos (ativação %CD63).

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Reconstituição
Tampão de estímulo contém cálcio, heparina e IL-3	1 frasco-ampola liofilizado	B-CCR-STB	Reconstituir com 50 mL de água ¹⁾
Controle de estímulos mAb anti-FcεRI	1 frasco-ampola liofilizado	B-CCR-STCON	Reconstituir com 1,5 mL de B-CCR-STB
Controle de estímulos fMLP ²⁾	1 frasco-ampola liofilizado	B-CCR-FMLP	Reconstituir com 1,5 mL de B-CCR-STB
Reagente de coloração Mistura de mAb anti-CD63-FITC and anti-CCR3-PE	1 frasco-ampola 2,2 mL	B-CCR-SR	Pronto para utilização
Reagente de lise ³⁾ 10x concentrado	1 frasco-ampola 25 mL	B-CCR-LYR	Diluir com 225 mL de água deionizada
Tampão de lavagem com 0,1% formaldeído	1 frasco-ampola 100 mL	B-CCR-WB	Pronto para utilização

Tabela 1

¹⁾ Para ver a qualidade da água necessária, consulte o capítulo

Precauções técnicas

²⁾ N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

³⁾ Os cristais podem ser formados durante armazenamento a 2–8 °C e devem ser dissolvidos a 18–28 °C antes da diluição

ARMAZENAMENTO E VIDA ÚTIL DOS REAGENTES

Reagentes não abertos	
Guarde a uma temperatura na faixa de 2–8 °C. Não use os reagentes depois da data de validade impressa nos rótulos.	
Reagentes abertos e reconstituídos	
Tampão de estímulo	Estável a -20 °C por 6 meses. Se esperar repetir o uso, obtenha alíquotas.
Controle de estímulos	
Controle de estímulos fMLP	
Reagente de lise	Estável a 2-8 °C por 6 meses.
Reagente de coloração	
Tampão de lavagem	

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM NÃO FORNECIDOS

- Tubos de venopunção com K-EDTA
- Centrífuga
- Tubos de ensaio descartáveis para citometria de fluxo em polistireno ou polipropileno apirogênicos
- Estante de tubos de ensaio para citometria de fluxo para estímulo
- Misturador vórtex
- Placas de microtitulação com grau de cultura de tecido (opcionais) para estímulo das células e coloração para o protocolo padrão
- Placas de poço profundo (opcionais) para estímulo das células, coloração, lise e aquisição de citometria de fluxo para o protocolo lise sem lavagem
- Pipetas de precisão com ponteiros descartáveis apirogênicos:
 - 10–100 µL e 100–1000 µL,
 - Pipeta de 1–5 mL ajustável e
 - Opcional: dispensador ajustável 10–50 µL
- Cilindro 50 mL para reconstituição de tampão de estímulo
- Água estéril, ultrapura e apirogênica para reconstituição do tampão de estímulo (consulte o capítulo Precauções técnicas)
- Banho-maria (recomendado) ou incubadora a 37 °C
- Água destilada ou deionizada, além da vidraria de laboratório apropriada para a diluição do reagente de lise
- Tampas ou parafilme para cobrir os tubos durante etapas de incubação
- Dispensadores para reagentes de lise e tampão de lavagem
- Citômetro de fluxo equipado com fonte de laser 488 nm (azul) e filtros de emissão para detecção PE e FITC
- O software de análise da citometria de fluxo (consulte o capítulo Aquisição de dados da citometria de fluxo)

ALÉRGERNOS DEVEM SER PEDIDOS SEPARADAMENTE

Os alérgenos validados para o Flow CAST® são oferecidos separadamente pela BÜHLMANN. Para obter os códigos de pedido e as informações sobre a preparação dos alérgenos, consulte os manuais de alérgenos da BÜHLMANN no website:

www.buhlmannlabs.ch

Importante: O Flow CAST® foi testado apenas em combinação com os alérgenos CAST® disponibilizados pela BÜHLMANN Laboratories AG. É responsabilidade exclusiva do laboratório validar o uso de alérgenos obtidos de outras origens.

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- O tampão de estímulo (B-CCR-STB) deste teste contém componentes de origem humana. Embora testados negativos para o antígeno de superfície do HBV, anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções, sempre de acordo com Boas Práticas Laboratoriais (BPL) e usando-se as precauções apropriadas.
- Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com quantidades abundantes de água.
- Os reagentes e compostos químicos devem ser tratados como resíduos perigosos, em conformidade com as diretrizes ou regulamentações nacionais de segurança de riscos biológicos.

Precauções técnicas

- Qualidade da água recomendada para o Flow CAST®: O uso de água estéril, ultrapura e aprotéica para reconstituir o tampão de estímulo (B-CCR-STB) é essencial para um estímulo de basófilos bom e reproduzível. Podem ser usadas as seguintes fontes de água: água com grau de cultura celular, água com grau de infusão ou deionizada, água duplamente destilada que seja ultrafiltrada em ultrafiltro de 10 kDa sanitizado periodicamente.
- O reagente de lise (B-CCR-LYR) pode ser reconstituído com água duplamente destilada deionizada ou água com a mesma qualidade da usada para a reconstituição do tampão de estímulo.
- Evite a contaminação com alérgenos durante o estímulo celular: Aeroalérgenos presentes no laboratório podem contaminar amostras de sangue e suspensões celulares abertas, elevando a referência. Amostras de sangue e tubos de estímulo celular devem ser cuidadosamente cobertos com tampas ou parafilmes. Evite ácaros da poeira doméstica, plantas em polinização, luvas de látex ou equipamento que contenha látex, evite também deixar as janelas abertas no laboratório em que o estímulo das células é realizado. É recomendado realizar as etapas de preparação e estímulo das células em uma capela de fluxo laminar.
- Recomenda-se banho-maria em um incubador, em razão da transferência de calor mais eficiente. Se estiver usando um incubador, verifique se a temperatura é 37 °C. Temperaturas mais baixas ou mais altas podem afetar os resultados.

- De modo geral, é esperado um nível baixo de ativação de basófilos para os alérgenos de fármacos. Portanto, é crucial que sejam alcançadas as condições ideais durante o estímulo, inclusive de temperatura. É recomendado o uso de tubos individuais no lugar das placas de poço profundo para alérgenos de fármacos.
- Os componentes não devem ser usados depois da data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture lotes diferentes de reagentes.
- Evite contaminação dos reagentes.

Procedimento do ensaio

- Equilibre o reagente de lise em temperatura ambiente (18–28 °C).
- Leia atentamente as instruções antes de executar o teste. O desempenho do teste será afetado negativamente se os reagentes forem diluídos incorretamente, ou se forem manuseados ou armazenados sob condições diferentes daquelas detalhadas nesta instrução de uso.
- As amostras que não forem apropriadamente manipuladas podem apresentar resultados inexatos.
- Verifique visualmente as preparações para avaliar a eficácia da lise. Os eritrócitos podem não ser completamente lisados e aparecerem no mesmo local que os leucócitos no histograma de difração da luz.
- O tempo de lise prolongado pode levar a perda celular. Confirme que há pelo menos 300 basófilos para a aquisição de dados. Recomendamos que a aquisição de dados das amostras processadas com o protocolo lise sem lavagem seja realizada dentro de uma hora.
- A citometria de fluxo pode resultar em resultados falsos se o citômetro de fluxo estiver desalinhado, a emissão de fluorescência não tiver sido compensada adequadamente, as regiões de agrupamento não tiverem sido adequadamente posicionadas.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

É recomendado que os pacientes evitem antialérgicos administrados sistemicamente, como corticoides, ácido cromoglicólico (DSCG) por 24 horas antes da coleta de amostra de sangue.

Colete o sangue em **tubos de venopunção com K-EDTA** preenchendo os tubos até a marca de volume dedicada. Os tubos devem ser preenchidos pelo menos até a metade. Um (1) mL de sangue total é suficiente para aproximadamente 18 tubos de ensaio.

Não centrifugue nem congele as amostras de sangue.

Sangue total

As amostras de sangue total armazenadas a 2–8 °C devem ser processadas em até 48 horas depois da coleta.

Para determinar as reações alérgicas aos fármacos, é aconselhado processar as amostras imediatamente e em no máximo 24 depois da coleta.

As amostras de sangue total também podem ser mantidas em temperatura ambiente (temperaturas de até 28 °C). Devem, no entanto, ser processadas em até 24 horas da coleta usando o protocolo padrão ou no dia da coleta usando o protocolo lise sem lavagem.

Amostras processadas

As células processadas usando o protocolo padrão são fixadas. As células fixadas podem ser armazenadas a 2–8 °C por 5 dias protegidas da luz para posterior aquisição por citometria de fluxo.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Misture a amostra de sangue anticoagulada invertendo o tubo de venopunção várias vezes.
2. Prepare novos tubos para citometria de fluxo alogênicos em poliestireno ou polipropileno.
3. Para cada paciente, etiquete os tubos, p.ex., da seguinte forma:

PB = referência do paciente

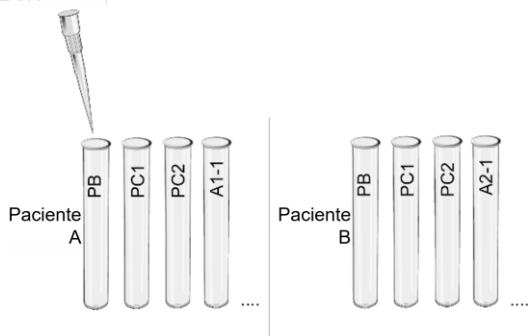
PC1 = controle de estímulo com Ab anti-FcεRI

PC2 = controle de estímulo com fMLP

A1-1 para alérgeno 1 com diluição 1

A1-2 para alérgeno 1 com diluição 2 etc.

50 µL estímulo
100 µL STB
50 µL sangue
20 µL SR



Estímulo e coloração

4. Adicione 50 µL do estímulo correspondente a cada tubo:
tubo PB: 50 µL de **tampão de estímulo** (referência do paciente)
tubo PC1: 50 mL **controle de estímulo** mAb anti-FcεRI
tubo PC2: 50 mL **controle de estímulo** fMLP
Tubo Ax-y: 50 mL de **alérgeno**
5. Adicione 100 µL de tampão de estímulo (STB) a cada tubo.
6. Adicione 50 µL do sangue total do paciente a cada tubo. Confirme que a lateral e o topo do tubo estejam livres de sangue.
7. Misture com cuidado.
8. Adicione 20 µL do reagente de coloração (CR) a cada tubo.
9. Misture com cuidado, cubra os tubos e incube por 15 minutos a 37 °C em **banho-maria**.

Nota: Se for usado incubador em vez de banho-maria, o tempo de incubação é prolongado para 25 minutos por conta da transferência de calor menos eficiente.

Lise

Nota: Equilibre o reagente de lise em temperatura ambiente (18–28 °C).

Protocolo padrão: Lise e lave

10. Adicione 2 mL de reagente de lise equilibrado (18–28 °C) a cada tubo, misture com cuidado.
11. Incube por 5-10 minutos a 18–28 °C.
12. Centrifugue os tubos por 5 minutos a 500 x g.
13. Decante o sobrenadante usando papel mata-borrão.
14. Ressuspenda o pelete de células com 300 µL de tampão de lavagem (há um fixante incluído no tampão de lavagem).
15. Misture em vórtex com cuidado.
- 16.a **Ou** adquira as amostras no citômetro de fluxo.

Ou 16.b Se não adquirir imediatamente, deixe as amostras incubarem por 30 min em RT e protegidas da luz (fixação). Armazene as amostras vedadas e protegidas da luz a 2–8 °C até a medição. As células fixadas podem ser armazenadas a 2–8 °C por 5 dias para posterior aquisição por citometria de fluxo. Vortex suavemente os tubos de amostra antes da aquisição.

Nota: As amostras fixadas armazenadas podem ser adquiridas sem pré-tratamento a qualquer momento. Consulte a seção Coleta e armazenamento de amostras para ver o tempo de armazenamento. Pode ser observada uma leve diminuição na intensidade da fluorescência e uma menor recuperação dos basófilos ≥80% depois de armazenagem longa.

Protocolo alternativo: Protocolo lise sem lavagem

Citômetros de fluxo de alto desempenho e de nova geração podem analisar amostras lisadas e não lavadas. Esse procedimento deve ser adaptado ao instrumento de citometria de fluxo usado e pode necessitar de otimização. O protocolo abaixo baseia-se em dados adquiridos com o citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher).

10. Realize as etapas 1 a 9 (acima) do procedimento de ensaio e depois continue a etapa 10. Adicione 1,5 ± 0,5 mL de reagente de lise equilibrado (18–28 °C) a cada tubo, misture com cuidado (o volume deve ser otimizado dependendo das capacidades de velocidade de aquisição do citômetro de fluxo usado).
11. Adquira as amostras usando o citômetro de fluxo de alta produtividade adequado, em alta velocidade de aquisição, para manter o tempo de análise mínimo.

Nota: As amostras devem ser analisadas em até 24 horas do recebimento. Consulte a seção Coleta e armazenamento de amostras.

AQUISIÇÃO DE DADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

A aquisição da citometria de fluxo pode ser realizada em qualquer citômetro de fluxo trabalhando com um diodo com laser de argônio de 488 nm (luz de excitação azul-verde). O citômetro de fluxo deve estar equipado para detectar a dispersão frontal (FSC), a dispersão lateral (SSC) e os dois fluorocromos FITC e canais PE.

Confirme que o citômetro de fluxo esteja adequadamente alinhado e que a compensação de cores esteja definida. Para a aquisição e caracterização apropriadas dos basófilos em repouso e ativados, crie os seguintes histogramas:

1. Crie o histograma 1, como dispersão frontal v. dispersão lateral, para adquirir toda a população de leucócitos, como mostrado na Figura 1. Durante a aquisição das amostras, confirme que a população de leucócitos esteja separada em três populações distintas (linfócitos, monócitos e granulócitos) no histograma FSC/SSC. Ajuste a amplificação (ganho) dos sinais de FSC e SSC para obter uma distribuição como mostrada na Figura 1. Consulte as instruções nos manuais do citômetro de fluxo.
2. Crie o histograma 2, como CCR3-PE v. dispersão lateral, como mostrado na Figura 2. Defina um grupo (p.ex., basófilos) incluindo toda a população de basófilos como CCR3^{pos} e SSC^{low}, como mostrado no grupo do retângulo na Figura 2. Eosinófilos que também sejam CCR3^{pos} devem ser excluídos com base na SSC alta.
3. Crie o histograma 3, como CD63-FITC v. CCR3-PE, mostrando apenas os basófilos agrupados, como mostrado na Figura 3. Use os basófilos em repouso não estimulados do tubo de referência do paciente (PB) para definir um grupo de quadrante que inclua as células de basófilos negativas para CD63 no quadrante inferior direito (CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{low}), como mostrado na Figura 3. Os basófilos ativados pelo estímulos de controles positivos e alérgenos específicos resultarão em população de basófilos positivas para CD63 (CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}) identificadas no quadrante superior direito, como mostrado na Figura 4 com um exemplo de estímulo de controle positivo (STCON).

A leitura do ensaio é indicada como a razão de basófilos positivos para CD63 por todos os basófilos (ativação %CD63), conforme a identificação no grupo de quadrante do histograma 3, para qualquer tubo de estímulo.

ANÁLISE DE DADOS

Os dados adquiridos são analisados com o software de citometria de fluxo apropriado. Defina histogramas e grupos semelhantes aos definidos para a aquisição.

Os grupos que identificam os basófilos no histograma 2 podem ser adaptados independentemente em qualquer dos estímulos para a mesma mostra de pacientes.

Para a avaliação e a padronização correta dos resultados, é definida uma configuração de referência para cada paciente usando o estímulo de referência do paciente (PB). O grupo do quadrante definido no histograma 3 deve ser definido na PB. Para padronizar a análise, o agrupamento é definido entre 2 e 2,5% de basófilos ativados na amostra PB de cada paciente (veja Figura 3).

Este grupo deve ser aplicado a todos os estímulos subsequentes do mesmo paciente (PC1, PC2 e todos os alérgenos medidos) para calcular o percentual de células CD63 positivas em qualquer estímulo (veja Figura 4).

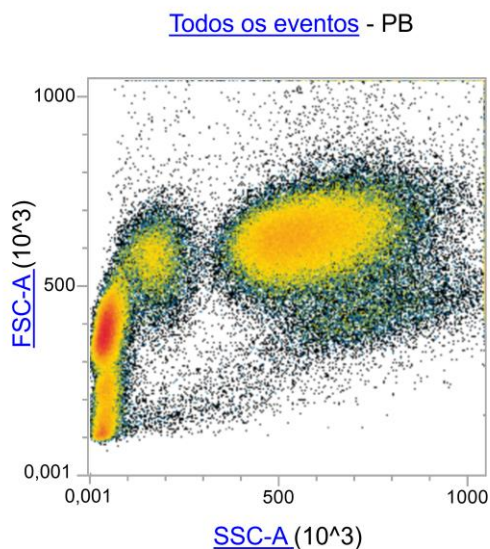


Figura 1: Três populações distintas (linfócitos, monócitos e granulócitos) no histograma FSC/SSC.

Adquira 500 ou mais células basofílicas para qualquer tubo de estímulo (agrupados como mostrado no histograma 2, Figura 2 abaixo). Se forem adquiridas menos de 300 células basofílicas (p.ex., no caso de basopenia), não é possível avaliar os resultados do teste.

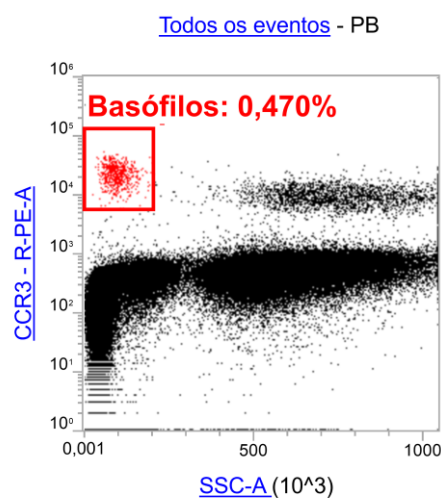
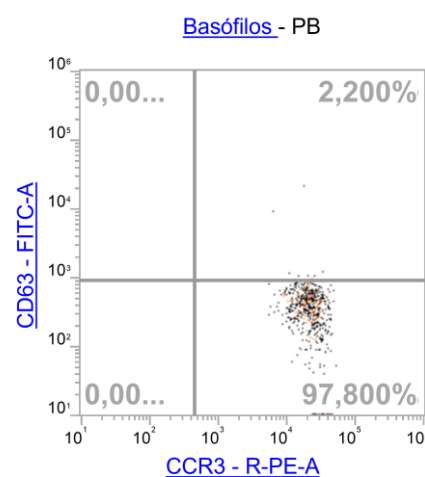
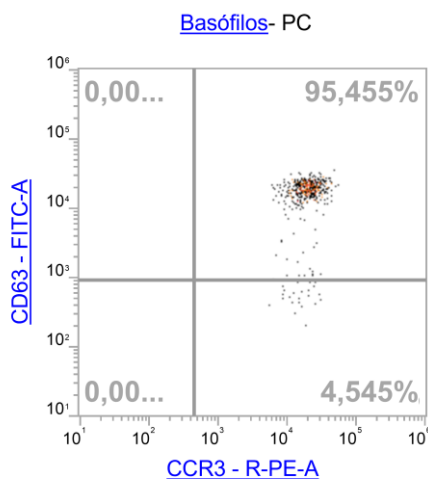


Figura 2: Seleção de células basofílicas CCR3^{pos} / SSC^{low}



Região agrupada	Contagem (n=)	%
Total	125'864	100,0
Basófilos	591	0,47
Q2 (CD63 ^{pos})	13	2,2
Q4 (CD63 ^{neg})	578	97,8

Figura 3: Referência do paciente (PB) apenas com STB



Região agrupada	Contagem (n=)	%
Total	130'926	100,0
Basófilos	506	0,39
Q2 (CD63 ^{pos})	483	95,5
Q4 (CD63 ^{neg})	23	4,5

Figura 4: Controle de estímulos (STCON)

CONTROLE DE QUALIDADE

Os seguintes critérios e medidas de controle de qualidade devem ser atendidos para que o resultado seja válido:

Populações de leucócitos: Tipicamente, três populações diferentes de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos, devem aparecer no gráfico de FSC/SSC (veja Figura 1). A ocorrência deles pode ser considerada como critério para a qualidade da amostra de sangue (tempo entre a coleta de amostra e a execução do ensaio, condições de armazenamento). Se forem adquiridas menos de 300 basófilos, não é possível avaliar os resultados do teste.

Controles de estímulos (positivos) mAb e fMLP anti-FcεRI: mAb Anti-FcεRI reproduz a ligação do receptor causada pelo alérgeno *in vivo*. fMLP é um tripeptídeo que causa ativação dos basófilos de maneira não imunológica.

- Se o controle mAb Anti-FcεRI apresentar um valor $\geq 10\%$ de basófilos ativados, as amostras podem ser avaliadas.
- Se o controle fMLP mostrar sinal $\geq 10\%$, e o mAb Anti-FcεRI não, o ensaio foi executado corretamente, mas os resultados do teste não poderão ser avaliados. O paciente é considerado um IgE não responsivo.
- Se tanto o mAb Anti-FcεRI mAb como o fMLP apresentarem valores $<10\%$ de basófilos ativados, é provável ter ocorrido um erro técnico. O resultado do teste deve ser considerado inválido, e o teste deve ser repetido.

PADRONIZAÇÃO

O Flow CAST® detecta a população de basófilos que expressam o marcador de superfície celular CD63 em % dos basófilos totais. Não existem materiais de referência ou procedimentos de medição de referência reconhecidos internacional ou nacionalmente para esse analito.

A reprodutibilidade lote a lote é garantida pela titulação dos conjugados de anticorpos monoclonais anti-CD63-FITC e anti-CCR3-PE contra os leitos de calibração. Para ver uma estimativa da variação lote a lote, consulte os resultados de reprodutibilidade na seção características de desempenho.

LIMITAÇÕES

- Os resultados dos testes do Flow CAST® devem ser interpretados em combinação com outros achados clínicos e laboratoriais.
- Para determinar doenças alérgicas relacionadas a fármacos, o teste BAT deve ser realizado em até 6 meses da reação alérgica (ref. 8).
- Confirme que tenham se passado pelo menos duas semanas desde a reação alérgica antes de realizar o teste BAT (re. 8).
- Os resultados negativos obtidos dos alérgenos de fármacos não devem ser usados para exclusão de alergia.
- É esperado que 5 a 10% dos pacientes sejam IgE não responsivos. Para esses pacientes, não serão observados suprarregulação da expressão de CD63 e resultado positivo. Os não responsivos podem ser identificados usando os controles de estímulo que acompanham o teste Flow CAST® (ref. 9).
- Tubos com K-EDTA com preenchimento insuficiente (menos da metade) podem causar resultados falso-negativos.
- É esperada interferência nos resultados do teste com Flow CAST® para os pacientes que tomam omalizumabe (XOLAIR®) (ref. 10).
- Antialérgicos administrados sistemicamente, como corticoides, ácido cromoglicólico (DSCG), devem ser evitados por 24 horas antes da coleta de amostra de sangue.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As categorias de resultado do Flow CAST® são:

Resultado	Interpretação
< corte	negativo
\geq corte para uma ou ambas diluições do alérgeno.	positivo

Tabela 3

CORTE E INTERVALO DE REFERÊNCIA

Foi estabelecido um corte técnico de 5% de basófilos ativados, com resultados $\geq 5\%$ CD63^{pos} indicando ativação de basófilos.

Para cada alérgeno, a especificidade melhorada é alcançada usando-se o corte específico para o alérgeno como indicado nos Manuais de Alérgenos da BÜHLMANN.

Os intervalos de referência foram estabelecidos de acordo com CLSI C28-A3. Cento e vinte (120) amostras de sangue de um centro de doação de sangue foram estimulados com tampão de estímulo ou mAb Anti-FcεRI e testados de acordo com os protocolos padrão e lise sem lavar. O teste foi realizado no decorrer de 26 dias por três operadores, com dois lotes de reagentes Flow CAST®.

Controle	Ensaio Protocolo	Intervalo de referência (IC 90%) [% CD63 ^{pos}]	
		2,5º percentil	97,5º percentil
Tampão de estímulo	padrão	0,8 (0,5–1,2)	4,6 (4,1–6,4)
	lise sem lavagem	0,9 (0,6–1,0)	4,2 (3,9–5,3)
mAb anti-FcεRI	padrão	18,0 (11,5–26,0)	97,7 (96,0–98,5)
	lise sem lavagem	13,2 (11,4–21,2)	96,4 (94,3–97,3)

Tabela 4

DESEMPENHO CLÍNICO

O desempenho clínico do Flow CAST® foi avaliado em uma revisão sistemática da literatura. Onze estudos revisados por pares identificados em uma pesquisa sistemática da literatura cobrindo um período encerrado em novembro de 2019; um estudo de venenos de insetos não identificado na pesquisa original e dois estudos de alérgenos de amendoins publicados depois de 2019 foram incluídos na análise. Os estudos investigaram a capacidade do Flow CAST® para diferenciar entre participantes com doenças alérgicas e sujeitos não alérgicos. Os distúrbios alérgicos no sujeito alérgico foram confirmadas por a) histórico clínico do paciente, b) teste de provocação oral com alimentos (TPO), c) histórico clínico e teste laboratorial (teste cutâneo de leitura imediata [Prick Test], sIgE) ou d) histórico clínico e autoteste/teste de provocação e participantes não alérgicos. Estudos que usaram sIgE ou TPO como a única referência clínica foram excluídos. Os resultados estão resumidos na Tabela 5.

Grupo de alérgeno	N estudos	Sensibilidade mediana (faixa)	Participante alérgicos (total)	Especificidade mediana (faixa)	Participantes controle (total)
Alimentos Inalatórios	5	92% (81–100%)	311	93% (80–100%)	240
Venenos de insetos	2	87% (73–89%)	79	96% (95–97%)	39
Fármacos	7	55% (0–68%)	227	91% (79–100%)	167

Tabela 5

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Precisão intralaboratorial: ≤25% CV for estímulo

A repetibilidade (em uma mesma corrida) e a precisão intralaboratorial foram determinadas com base na diretriz EP05-A3 do CLSI e a norma ISO 15197:2013. Quatro amostras de sangue de doadores foram estimuladas com tampão de estímulo ou controle de estímulo mAb anti-FcεRI. Para o procedimento padrão, foi usado um desenho de estudo de 2 operadores x 4 dias x 1 corrida x 4 replicatas. Para a lise sem lavagem, foi aplicado um desenho de estudo de 2 operadores x 1 dia x 4 corridas x 4 replicatas. Uma replicata corresponde a uma reação de estímulo independente e um procedimento de ensaio completo. Os resultados do controle de estímulo mAb anti-FcεRI estão resumidos na Tabela 6.

Protocolo de ensaio	Doador	Média [%CD63]	n	Intracorrída [% do CV]	Interdiárias (A) Intercorrídas (B) [% do CV]	Total [%CV]
padrão (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%
lise sem lavagem (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%

Tabela 6

Reprodutibilidade: ≤25% CV para estímulo

A repetibilidade foi estabelecida com base na diretriz EP05-A3 do CLSI e a norma ISO 15197:2013. Quatro amostras de sangue de doadores foram estimuladas com tampão de estímulo ou controle de estímulo mAb anti-FcεRI. As amostras foram submetidas a ensaio em dois laboratórios de acordo com o protocolo padrão. Foi aplicado desenho de estudo com 3 instrumentos/lote 2 operadores x 1 dia x 5 replicatas. Uma replicata corresponde a uma reação de estímulo independente e um procedimento de ensaio completo. Os resultados do controle de estímulo mAb anti-FcεRI estão resumidos na Tabela 7.

Doador	Média [%CD63]	n	Intracorrída [% do CV]	Interoperadores [%CV]	Interlotes/ interinstrumentos [%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%

Tabela 7

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

A suscetibilidade do ensaio Flow CAST® a fármacos, condições anormais do sangue e ao aditivo K-EDTA da amostra foi avaliada de acordo com a diretriz EP07-A2 do CLSI. Desvios nos resultados superiores a 20% para o controle de estímulo mAb anti-FcεRI e 20% CD63^{pos} (absoluto) para o controle de estímulo FMLP foram considerados como interferências. Não foram detectadas interferências nas concentrações informadas com as substâncias listadas na Tabela 8 nas concentrações listadas. Foi detectada interferência com K-EDTA no tubo de venopunção com concentração dobrada de K-EDTA de um doador.

Componente ativo	Concentração de teste [µg/g]
Cloridrato de fexofenadina	1,6
Cloridrato de cetirizina	4,35
Cloridrato de hidroxizina	0,27
Cetotifeno	0,6
Montelukast	3,84
Prednisona	1,2
N-acetil-L-triptofano	30
Triglicérides (intra lipídios)	20.000
Bilirrubina conjugada	400
Bilirrubina não conjugada	400
Hemólise	56.100

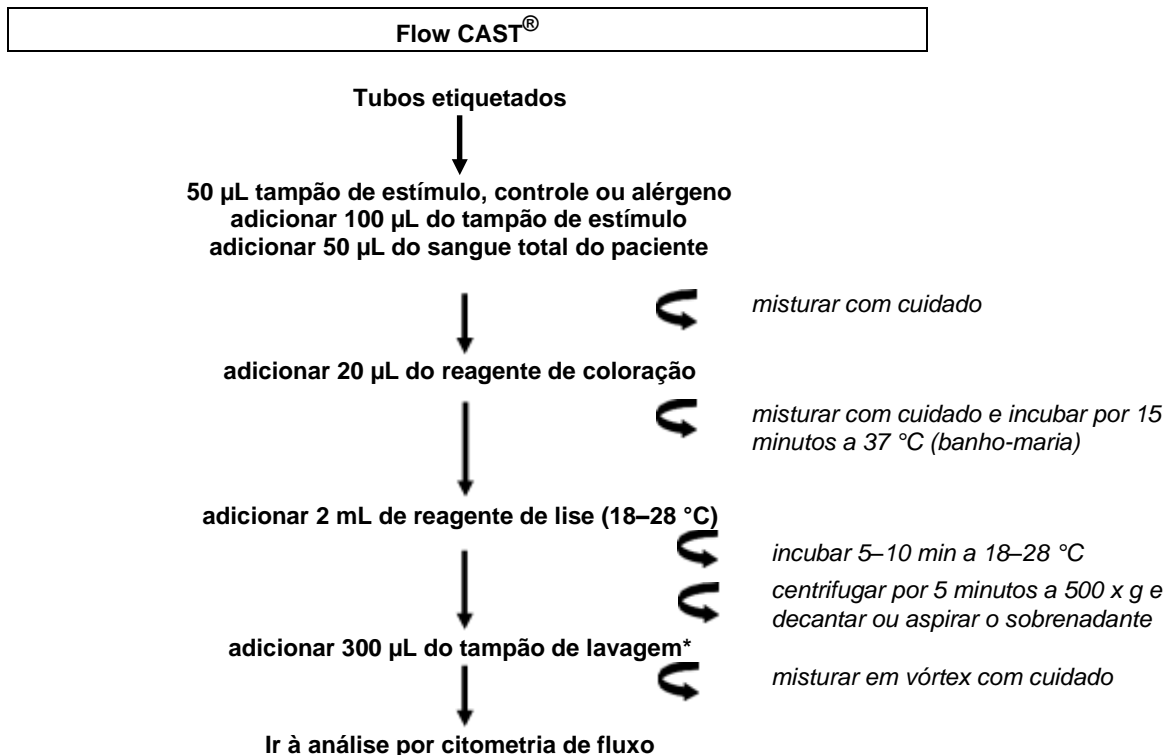
Tabela 8

REFERÊNCIAS

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).

PROCOLOS CURTOS

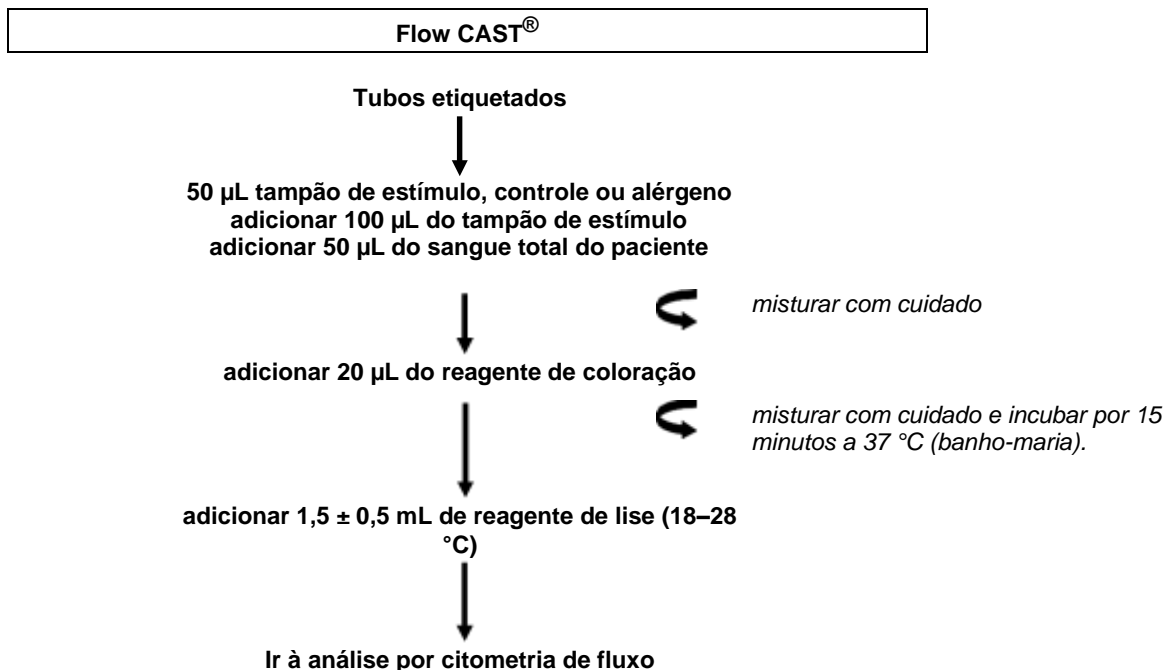
PROCOLO PADRÃO: LISE E LAVE



Tempo Até A Aquisição ~30 MIN / Tempo Até O Resultado: ~1 Hora

*Observação: Dependendo do citômetro de fluxo usado, a quantidade de tampão de lavagem deve ser adaptada de acordo com o volume morto e a densidade celular compatível com o instrumento.

PROCOLO ALTERNATIVO: PROCOLO LISE SEM LAVAGEM



TEMPO ATÉ A AQUISIÇÃO ~20 MIN / TEMPO ATÉ O RESULTADO: ~1 HORA

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Data	Versão	Alteração
2023-06-21	A2	Reformulações no capítulo <i>Análise de dados e Desempenho clínico</i> Incluído o número do órgão notificado na marcação CE - procedimento de avaliação de conformidade de acordo com a regulamentação IVDR 2017/746

NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE

Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.

DANOS DE TRANSPORTE

Informe seu distribuidor caso o produto seja recebido danificado.

SÍMBOLOS

A BÜHLMANN usa os símbolos e sinais listados e descritos na ISO 15223-1. Além disso, são usados os símbolos e sinais a seguir:

Símbolo	Explicação
BUF STIM	Tampão de estímulo
CONTROL STIM	Controle de estímulos
CONTROL FMLP	Controle de estímulos fMLP
REAG STAIN	Reagente de coloração
REAG LYS	Reagente de lise
BUF WASH	Tampão de lavagem

