



# Flow CAST<sup>®</sup>

## Test aktivacije bazofila (BAT)- Protočna citometrija

za *in vitro* dijagnostičku upotrebu

FK-CCR 100 testova

Datum izdavanja: 2023-06-21  
Verzija A2

---

 **Proizvođač**

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



## NAMENA

BÜHLMANN Flow CAST® je *in vitro* dijagnostički test za kvalitativnu procenu aktivacije bazofila nakon stimulacije specifičnim alergenima. Test se zasniva na protočnoj citometriji i omogućava određivanja populacije bazofila koja ima CD63 marker na površini ćelija, iz uzoraka pune krvi pacijenata sa dodatkom K-EDTA. Flow CAST® je namenjen kao pomoć prilikom postavljanja dijagnoze trenutnog tipa alergijske reakcije, zajedno sa drugim kliničkim i laboratorijskim nalazima.

Samo za laboratorijsku upotrebu.

## PRINCIP TESTA

Flow CAST® je test aktivacije bazofila i funkcioniše po principu protočne citometrije (ref. 1, 2). Uzorak pune krvi pacijenta se stimuliše specifičnim alergenima, kao i stimulacionim puferom i stimulacionim kontrolama, radi evaluacije degranulacije bazofila pacijenta *ex vivo*. Uzorak se obeležava pomoću dva fluorescentno obeležena monoklonska antitela: jedno za selekciju bazofila (anti-CCR3-PE) i jedno za određivanje statusa aktivacije bazofila (anti-CD63-FITC) (ref.3-6) CD63 je transmembranski protein prisutan na intracelularnim vezikulama i pojavljuje se samo na površini ćelije nakon degranulacije bazofila (ref. 7). Eritrociti iz uzorka pacijenta se uklanjaju reakcijom liziranja. U zavisnosti od protokola, ćelije se centrifugiraju, resuspenduju u puferu za ispiranje i fiksiraju za kasniju analizu protočnom citometrijom ili analiziraju direktno nakon liziranja. Bazofili se izdvajaju iz populacije leukocita kao CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>. Status aktivacije izdvojenih bazofila je određen njihovom ekspresijom CD63 (aktivacioni marker). Pacijenti koji nemaju IgE posredovane alergijske odgovore, tzv. non-responder osobe, identifikuju se na osnovu rezultata pozitivnih kontrola. Očitavanje testa je naznačeno kroz odnos CD63 pozitivnih bazofila u odnosu na sve bazofile (% aktivacije CD63).

## OBEZBEĐENI REAGENSI I PRIPREMA

Reagensi	Količina	Kod	Komentari
<b>Stimulacioni pufer</b> sadrži kalcijum, heparin i IL-3	1 bočica liofilizat	B-CCR-STB	Rekonstituisati sa 50 mL vode <sup>1)</sup>
<b>Stimulaciona kontrola</b> anti-FcεRI mAb	1 bočica liofilizat	B-CCR- STCON	Rekonstituisati sa 1,5 mL B-CCR-STB
<b>Stimulaciona kontrola fMLP<sup>2)</sup></b>	1 bočica liofilizat	B-CCR-FMLP	Rekonstituisati sa 1,5 mL B-CCR-STB
<b>Reagens za bojenje</b> Mešavina anti-CD63-FITC i anti-CCR3-PE mAb	1 bočica 2,2 mL	B-CCR-SR	Spreman za upotrebu
<b>Reagens za liziranje<sup>3)</sup></b> 10x koncentrovan	1 bočica 25 mL	B-CCR-LYR	Razblažiti sa 225 mL dejonizovane vode
<b>Pufer za pranje</b> sa 0,1% formaldehida	1 bočica 100 mL	B-CCR-WB	Spreman za upotrebu

Tabela 1

<sup>1)</sup> Za potrebnu količinu vode, pogledati odeljak tehničke predostrožnosti

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

<sup>3)</sup> Tokom čuvanja na 2-8°C mogu se formirati kristali koje treba rastvoriti zagrevanjem na 18-28°C pre razblaživanja

## ČUVANJE I ROK UPOTREBE REAGENASA

Neotvoreni reagensi	
Čuvati na 2-8 °C. Ne koristiti kit nakon isteka roka upotrebe koji je odštampan na nalepnici.	
Otvoreni i rekonstituisani reagensi	
Stimulacioni pufer	Stabilni 6 meseci na -20 °C. Alikvotirati ako se očekuje ponovljena upotreba
Stimulaciona kontrola	
Stimulaciona kontrola fMLP	
Reagens za liziranje	Stabilni 6 meseci na 2-8 °C.
Reagens za bojenje	
Puffer za pranje	

Tabela 2

## MATERIJAL KOJI JE POTREBAN I NIJE OBEZBEĐEN

- K-EDTA tube za venepunkciju
- Centrifuga
- Epruvete za protočnu citometriju od polipropilena ili polistirena, apirogene, za jednokratnu upotrebu
- Stalci za epruvete za stimulaciju u protočnoj citometriji
- Vorteks mikser
- (Opciono) mikrotitarske ploče za kulturu tkiva za stimulaciju ćelija i bojenje za standardni protokol
- (Opciono) ploče sa dubokim udubljenjima za ćelijsku stimulaciju, bojenje, liziranje i akviziciju protočne citometrije za lyse-no-wash protokol
- Precizne pipete sa nastavcima za jednokratnu upotrebu apirogene:
  - 10-100 µL, 100-1000 µL,
  - 1-5 mL podesiva pipeta i
  - Opciono: 10-50 µL podesivi dispenzer
- Menzura od 50 mL za rekonstituciju pufera za stimulaciju
- Sterilna, ultraprečišćena i apirogena voda za rekonstituciju Stimulacionog pufera (pogledati poglavlje Tehničke mere predostrožnosti)
- Vodeno kupatilo (preporučeno) ili inkubator podešen na 37 °C
- Destilovana ili dejonizovana voda, kao i odgovarajuće laboratorijsko stakleno posuđe za razblaživanje reagensa za liziranje
- Poklopci ili parafilm za pokrivanje epruveta tokom koraka inkubacije
- Dispenseri za boce za reagens za liziranje i pufer za ispiranje
- Protočni citometar opremljen sa laserskim izvorom na 488 nm (plavi), kao i emisionim filterima za PE i FITC detekciju
- Softver za protočnu citometriju (pogledati poglavlje Prikupljanje podataka protočne citometrije)

## ALERGENI KOJI SE PORUČUJU ODVOJENO

Alergeni validirani za Flow CAST® BÜHLMANN obezbeđuje odvojeno. Za kataloške brojeve alergena kao i

informacije za pripremu pogledati BÜHLMANN Allergen brošuru na BÜHLMANN veb-sajtu:

www.buhlmannlabs.ch

**Važno:** Flow CAST® je testiran samo u kombinaciji sa CAST® Allergens dostupnim od BÜHLMANN Laboratories AG. Isključiva je odgovornost laboratorije da potvrdi upotrebu alergena dobijenih iz drugih izvora.

## **PREDOSTROŽNOSTI**

### **Bezbednosne predostrožnosti**

- Stimulacioni pufer (B-CCR-STB) ovog testa sadrži komponente humanog porekla. Iako su testirane i utvrđeno je da su negativne na površinski antigen HBV, anti-HCV i anti-HIV1/2 antitela, reagensima treba rukovati kao da mogu da prenesu infekcije i njima treba rukovati u skladu sa smernicama Dobre laboratorijske prakse (DLP) uz odgovarajuće mere predostrožnosti.
- Sprečiti kontakt reagensa sa kožom, očima ili sluzokožom. Ako dođe do kontakta, odmah isprati velikom količinom vode.
- Reagensi i hemikalije se moraju tretirati kao opasan otpad u skladu sa nacionalnim smernicama ili propisima o bezbednosti od bioloških opasnosti.

### **Tehničke predostrožnosti**

- Preporučeni kvalitet vode za Flow CAST®: Upotreba sterilne, ultra čiste i apirogene vode za rekonstituisanje stimulacionog pufera (B-CCR-STB) je neophodna za dobru i ponovljivu stimulaciju bazofila. Mogu se koristiti sledeći izvori vode: voda za ćelijske kulture, voda za infuziju ili dejonizovana, redestilovana voda i ultrafiltrirana u periodično dezinfikovanoj ultrafilteru od 10 kDa.
- Reagens za liziranje (B-CCR-LYR) se može rekonstituisati dejonizovanim, redestilovanim vodom ili vodom istog kvaliteta koji se koristi za rekonstituciju stimulacionog pufera.
- Sprečiti kontaminaciju alergenom tokom ćelijske stimulacije: Aeroalergeni u laboratoriji mogu kontaminirati otvorene uzorke krvi i ćelijske suspenzije, izazivajući povišeni background. Epruvete za uzorke krvi i za stimulaciju ćelija moraju biti pažljivo zatvorene čepovima ili parafilnom. Onemogućiti prisustvo grinja iz kućne prašine, polena biljaka, rukavica od lateksa ili drugog materijala koji potencijalno sadrži lateks. U laboratoriji u kojoj se vrši stimulacija ćelija prozori ne smeju biti otvoreni. Preporučuje se da se priprema ćelija i koraci stimulacije sprovedu u kabinetu sa laminarnim protokom.
- Preporučuje se vodeno kupatilo u odnosu na inkubator, zbog efikasnijeg prenosa toplote. Ako se koristi inkubator, proveriti da li je temperatura 37 °C. Niže ili više temperature mogu uticati na rezultate.
- Generalno se očekuje nizak nivo aktivacije bazofila za alergene iz lekova. Stoga je ključno da se postignu optimalni uslovi tokom stimulacije, uključujući temperaturu. Za alergene iz lekova preporučuje se upotreba pojedinačnih epruveta umesto ploča sa dubokim udubljenjima.
- Komponente se ne smeju koristiti nakon isteka roka upotrebe koji je odštampan na etiketi.
- Ne kombinovati različite lotove reagenasa.
- Sprečiti kontaminaciju reagensa.

## **Procedura testiranja**

- Omogućiti da Reagens za liziranje dostigne sobnu temperaturu (18-28 °C).
- Pažljivo pročitati uputstva pre započinjanja testa. Na performanse testa će negativno uticati pogrešno razblaživanje reagenasa, ako se njima pogrešno rukuje ili se skladište pod uslovima drugačijim od onih koji su navedeni u ovom uputstvu za upotrebu.
- Uzorci kojima se ne rukuje pravilno mogu uzrokovati netačne rezultate.
- Vizuelno proveriti preparate da bi se procenila efikasnost liziranja. Eritrociti mogu biti nepotpuno lizirani i pojaviti se na tačkama difrakcije svetlosti na istoj lokaciji kao i leukociti.
- Produženo vreme liziranja može dovesti do gubitka ćelija. Proveriti da li ima najmanje 300 bazofila za prikupljanje podataka. Preporučujemo da se uzimanje uzoraka obrađenih po protokolu lyse-no-wash obavi u roku od sat vremena.
- Protočna citometrija može dati lažne rezultate, ako citometar nije poravnat, emisija fluorescencije nije na odgovarajući način kompenzovana, gating regioni nisu pažljivo pozicionirani.

## **SAKUPLJANJE I ČUVANJE UZORAKA**

Pacijentima se preporučuje da izbegavaju sistemske antialergijske lekove kao što su kortikosteroidi, kromoglicinska kiselina (DSCG) najmanje 24 sata pre uzimanja uzorka krvi.

Sakupiti krv u **K-EDTA epruvete za venepunkciju**, punjenjem do oznake zapremine. Epruvete moraju biti napunjene najmanje do pola. Jedan (1) mL pune krvi je dovoljan za približno 18 epruveta.

**Ne centrifugirati i ne zamrzavati uzorke krvi.**

### **Puna krv**

Uzorke pune krvi koji su čuvani na 2-8 °C treba obraditi u roku od 48 sati od uzimanja.

Za utvrđivanje alergijskih poremećaja na lekove savetuje se da se uzorci obrade odmah, a najkasnije 24 sata nakon uzimanja uzorka.

Uzorci pune krvi se takođe mogu čuvati na sobnoj temperaturi (temperatura do 28 °C), međutim, moraju se obraditi u roku od 24 sata od prikupljanja primenom standardnog protokola ili na dan sakupljanja primenom lyse-no-wash protokola.

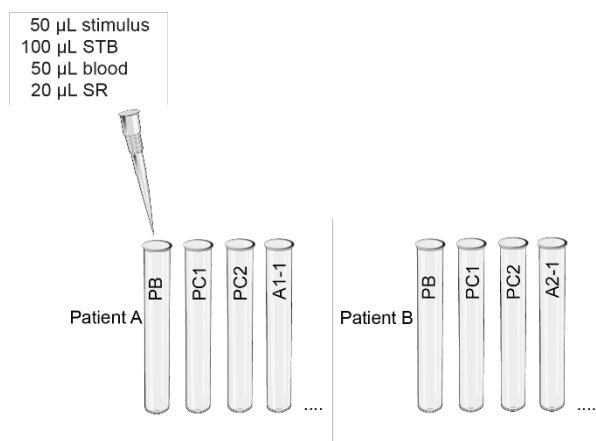
### **Procesuirani uzorci**

Ćelije obrađene standardnim protokolom su fiksirane. Fiksirane ćelije se mogu čuvati na 2-8 °C 5 dana zaštićene od svetlosti radi naknadne akvizicije pomoću protočne citometrije.

## **PROCEDURA TESTIRANJA**

1. Izmešati krv sa antikoagulisanim obrtanjem epruvete za venepunkciju nekoliko puta.
2. Pripremiti novu, apirogenu standardnu polipropilensku ili polistirensku epruvetu za citometriju.
3. Za svakog pacijenta obeležiti epruvetu, na primer:  
PB = background uzorka pacijenta  
PC1 = stimulaciona kontrola sa anti-FcεRI Ab  
PC2 = stimulaciona kontrola sa fMLP

A1-1 za alergen 1 sa razblaženjem 1  
A1-2 za alergen 1 sa razblaženjem 2 itd.



### Stimulacija i bojenje

4. Dodati 50 µL odgovarajućeg stimulusa u svaku epruvetu: PB epruveta: 50 µL **stimulacionog pufera** (background uzorka pacijenta)  
PC1 epruveta: 50 µL **stimulacione kontrole** anti-FcεRI mAb  
PC2 epruveta: 50 µL **stimulacione kontrole** fMLP  
Ax-y epruveta: 50 µL **alergena**
5. Dodati 100 µL stimulacionog pufera (STB) u svaku epruvetu.
6. Dodati 50 µL pune krvi pacijenta u svaku epruvetu. Proveriti da na stranama i vrhu epruvete nema krvi.
7. Pažljivo izmešati.
8. Dodati 20 µL reagensa za bojenje (SR) u svaku epruvetu.
9. Pažljivo izmešati, zatvoriti čep i inkubirati 15 minuta na 37°C na **vodenom kupatilu**.

**Napomena:** Ako se umesto vodenog kupatila koristi inkubator, vreme inkubacije se produžava na 25 minuta zbog manje efikasnog prenosa toplote.

### Liziranje

**Napomena:** Reagens za liziranje mora dostići sobnu temperaturu (18-28 °C).

#### Standardni protokol: liziranje i pranje (Lyse and wash)

10. Dodati 2 mL reagensa za liziranje sobne temperature (18-28 °C) u svaku epruvetu i pažljivo izmešati.
11. Inkubirati 5-10 minuta na 18-28 °C.
12. Centrifugirati epruvete 5 minuta na 500 x g.
13. Odliti supernatant upotrebom ubrusa.
14. Resuspendovati ćelijsku peletu sa 300 µL pufera za pranje (fiksativ se nalazi u puferu za pranje).
- Napomena:** Količina pufera za pranje može se prilagoditi specifičnom protočnom citometru koji se koristi, u skladu sa mrtvom zapreminom i gustinom ćelija kompatibilnom sa uređajem.
15. Pažljivo vorteksirati.

**Ili 16a.** Propustiti uzorke kroz protočni citometar.

**Ili 16b.** Ako se ne propuste odmah, ostaviti uzorke da se inkubiraju 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svetlosti (fiksacija). Čuvati uzorke zatvorene i zaštićene od svetlosti na 2-8 °C do merenja. Fiksirane ćelije se mogu

čuvati na 2-8 °C 5 dana za naknadnu akviziciju protočnom citometrijom. Vortex nežno uzorkuje cevi pre preuzimanja.

**Napomena:** Uzorci tretirani fiksativom koji se čuvaju, mogu se propustiti bez ikakvog prethodnog tretmana u bilo kom trenutku. Molimo pogledajte odeljak „Sakupljanje i čuvanje uzoraka” za vremenski period čuvanja. Blago smanjenje intenziteta fluorescencije i manji recovery bazofila ≥80% može se primetiti nakon dužeg čuvanja.

### Alternativni protokol: Lyse-no-wash protocol (Liziranje bez ispiranja)

Nove generacije protočnih citometara visokih performansi mogu da analiziraju lizirane, neoprane uzorke. Ova procedura mora biti prilagođena protočnom citometru koji se koristi i može zahtevati optimizaciju. Protokol u nastavku je zasnovan na podacima dobijenim pomoću Attune NxT protočnog citometra (Thermo Fisher).

10. Izvršiti korake procedure od 1 do 9 (gore), a zatim nastaviti sa korakom 10. Pažljivo dodati 1,5 ± 0,5 mL reagensa za liziranje koji je dostigao sobnu temperaturu (18-28 °C) u svaku epruvetu, (zapremina mora biti optimizovana u zavisnosti od mogućnosti brzine akvizicije protočnog citometra).
11. Propustiti uzorke koristeći pogodan protočni citometar velike propusnosti pri velikoj brzini prikupljanja, da bi vreme analize bilo minimalno.

**Napomena:** Uzorke treba analizirati u roku od 24 sata od prijema uzorka. Molimo pogledajte odeljak „Sakupljanje i čuvanje uzoraka“.

### AKVIZIJA PODATAKA PROTOČNE CITOMETRIJE

Protočna citometrija se može izvesti na bilo kom protočnom citometru koji ima argon lasersku diodu na 488 nm (plavo-zeleno ekscitaciono svetlo).

Protočni citometar mora biti opremljen tako da detektuje Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) i dva kanala za fluorohrome FITC i PE.

Proveriti da li je protočni citometar pravilno poravnat i da je podešena kompenzacija boje.

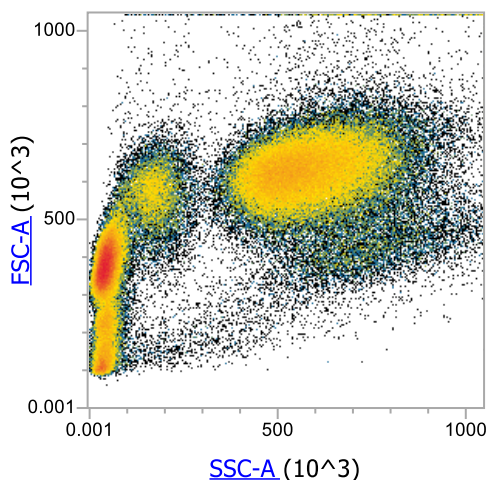
Za odgovarajuću akviziciju i karakterizaciju bazofila u mirovanju i aktiviranih bazofila napraviti sledeći histogram:

1. Kreirati histogram 1, kao Forward Scatter vs Side Scatter za akviziciju cele populacije leukocita kao što je prikazano na slici 1. Tokom akvizicije uzoraka, proveriti da li je populacija leukocita razdvojena u tri diskretne populacije (limfociti, monociti i granulociti) na FSC/SSC histogramu. Podesiti amplifikaciju (gain) FSC i SSC signala da bi se dobila distribucija kako je prikazano na slici 1. Pogledati uputstvo za protočni citometar za instrukcije.
2. Kreirati histogram 2, kao CCR3-PE vs Side Scatter kao što je prikazano na slici 2. Podesiti okvir (gate) (npr. bazofili) uključujući celu populaciju bazofila kao CCR3<sup>pos</sup> i SSC<sup>low</sup> kao što je prikazano na pravouganom gate-u na slici 2. Eozinofili, koji su takođe CCR3<sup>pos</sup>, moraju se isključiti na osnovu visokog SSC.
3. Kreirati histogram 3, kao CD63-FITC vs CCR3-PE, prikazujući samo gated bazofile, kao što je prikazano na slici 3. Koristiti nestimulisane bazofile u mirovanju iz epruvete za background pacijenta (PB) da biste postavili okvir kvadranta, uključujući CD63 negativne bazofile u donjem desnom kvadrantu (CD63<sup>neg</sup> CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>) kao što je prikazano na slici 3.

Bazofili aktivirani stimulacijom pozitivnih kontrola i specifični alergeni će dovesti do CD63 pozitivne populacije bazofila ( $CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{low}$ ) identifikovane u gornjem desnom kvadrantu, kao što je prikazano na slici 4 sa primerom pozitivne kontrole stimulacije (STCON).

Prikaz testa daje odnos CD63 pozitivnih bazofila u odnosu na sve bazofile (% aktivacije CD63) kao što je identifikovano u kvadrantnom gate-u histograma 3 za bilo koju od epruveta za stimulaciju.

All Events - PB



Slika1: Tri diskretne populacije (limfociti, monociti i granulociti) na FSC/SSC histogramu.

Propustiti 500 ili više bazofila za bilo koju epruvetu za stimulaciju (u okviru (gated) kao što je prikazano na histogramu 2, slika 2 dole). Ako se propusti manje od 300 bazofila (*npr.* u slučaju bazopenije), rezultati testa ne mogu se evaluirati.

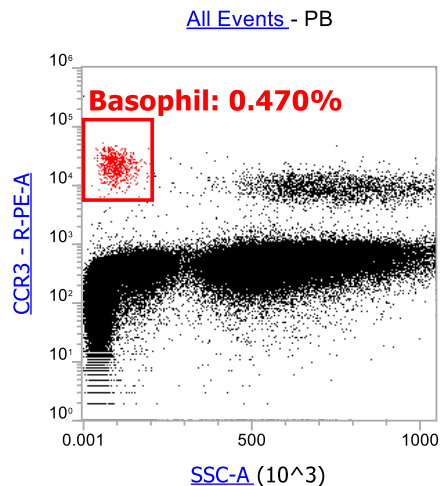
## ANALIZA PODATAKA

Dobijeni podaci se analiziraju odgovarajućim softverom za analizu protočne citometrije. Postaviti slične histograme i gate-ove kao što je urađeno za akviziciju.

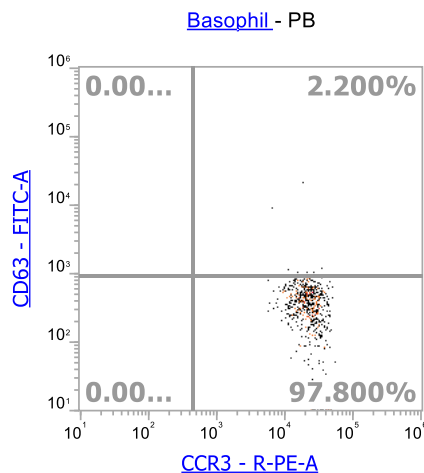
Gate-ovi koji identifikuju bazofile u histogramu 2 mogu se nezavisno prilagoditi u bilo kojoj od različitih stimulacija za isti uzorak pacijenta.

Za tačnu procenu i standardizaciju rezultata, background (pozadinsko) podešavanje za svakog pojedinačnog pacijenta se definiše korišćenjem bazalnog (osnovnog) nivoa nakon stimulacije bazofila pacijenta (PB). Gate kvadranta postavljen na histogramu 3 mora biti podešen na PB. Da bi se standardizovala analiza, gating je podešen da bude između 2 i 2.5% aktiviranih bazofila u uzorku PB svakog pacijenta (videti sliku 3).

Ovaj gate se mora primeniti na sve naredne stimulacije za iste pacijente (PC1, PC2 i svi izmereni alergeni) da bi se izračunao procenat CD63 pozitivnih ćelija u bilo kojoj stimulaciji (videti sliku 4).

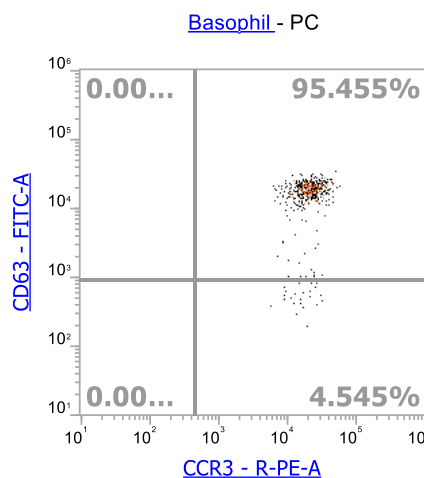


Slika 2: Selekcija bazofilnih ćelija  $CCR3^{pos} / SSC^{low}$



Gated Region	Broj (n=)	%
Ukupno	125 864	100,0
Bazofili	591	0,47
Q2 ( $CD63^{pos}$ )	13	2,2
Q4 ( $CD63^{neg}$ )	578	97,8

Slika 3: Background pacijenta (PB) samo sa STB



Gated Region	Broj (n=)	%
Ukupno	130 926	100,0
Bazofili	506	0,39
Q2 ( $CD63^{pos}$ )	483	95,5
Q4 ( $CD63^{neg}$ )	23	4,5

Slika 4: Stimulaciona kontrola (STCON)

## KONTROLA KVALITETA

Za validan rezultat treba da budu ispunjeni sledeći kriterijumi i merenja kontrole kvaliteta:

**Populacije leukocita:** Na FSC/SSC grafikonu tipično treba da se pojave tri različite populacije leukocita, limfociti, monociti i granulociti (videti sliku 1). Njihova pojava se može smatrati kriterijumom za kvalitet uzorka krvi (vremenski okvir između uzimanja uzorka i izvođenja analize, uslovi čuvanja). Rezultati testa se ne mogu proceniti ako se propusti manje od 300 bazofila.

**Stimulacine (pozitivne) kontrole anti-FcεRI mAb i fMLP:** Anti-FcεRI mAb oponaša premošćavanje receptora uzrokovano alergenom *in vivo*. fMLP je tripeptid koji uzrokuje neimunološku aktivaciju bazofila.

- Ako Anti-FcεRI mAb kontrola daje vrednost  $\geq 10\%$  aktivisanih bazofila, uzorci se ne mogu evaluirati.
- Ako samo fMLP kontrola daje signal  $\geq 10\%$ , ali ne i Anti-FcεRI mAb, testiranje je pravilno izvedeno, ali rezultati testa se ne mogu evaluirati. Pacijent se smatra IgE non-responderom.
- Ako su obe Anti-FcεRI mAb i fMLP vrednosti  $<10\%$  aktivisanih bazofila, verovatna je tehnička greška. Rezultat testa treba smatrati nevažecim i test treba ponoviti.

## STANDARDIZACIJA

Flow CAST® detektuje populaciju bazofila koji imaju eksprimiran površinski ćelijski marker CD63 kao % ukupnih bazofila. Ne postoje međunarodno ili nacionalno priznati referentni materijali ili referentni merni postupci za ovaj analit.

Reproducibilnost od lota do lota je zagarantovana titracijom konjugata anti-CD63-FITC i anti-CCR3-PE monoklonskih antitela na kalibracione kuglice. Za procenu varijacije od lota do lota, pogledati rezultate ponovljivosti u odeljku „Karakteristike performansi“.

## OGRANIČENJA

- Flow CAST® rezultate testa treba interpretirati zajedno sa drugim kliničkim i laboratorijskim nalazima.
- Da bi se utvrdili alergijski poremećaji povezani sa lekovima, BAT testiranje treba da se uradi u roku od 6 meseci od alergijske reakcije (ref. 8).
- Proveriti da li je prošla najmanje jedna do dve nedelje nakon alergijske reakcije pre nego što se izvede BAT testiranje (ref. 8).
- Negativne rezultate dobijene za alergene iz lekova ne bi trebalo koristiti za isključivanje alergije.
- Očekuje se da će 5 do 10% pacijenata biti IgE-non responderi. Za ove pacijente neće biti primećeno povećanje ekspresije CD63 i pozitivan rezultat. Osobe koje ne reaguju mogu se identifikovati korišćenjem stimulacionih kontrola koje se isporučuju sa Flow CAST® testom (ref. 9).
- Nedovoljno napunjene K-EDTA epruvete (manje od polovine) mogu dovesti do lažno negativnih rezultata.
- Očekuje se interferencija sa rezultatima testa Flow CAST® za pacijente koji su na terapiji omalizumabom (XOLAIR®) (ref. 10).

- Sistemske antialergijske lekove kao što su kortikosteroidi, kromoglicinska kiselina (DSCG) treba izbegavati najmanje 24 h pre uzimanja uzorka krvi.

## INTERPRETACIJA REZULTATA

Flow CAST® rezultati se kategorizuju na sledeći način:

Rezultat	Interpretacija
< cut-off	negativan
$\geq$ cut-off za jedno ili oba razblaženja alergena.	pozitivan

Tabela 3

## CUT-OFF I REFERENTNI INTERVALI

Ustanovljen je tehnički cut-off od 5% aktivisanih bazofila, gde su rezultati  $\geq 5\%$  CD63<sup>pos</sup> indikovani kao aktivacija bazofila.

Za svaki alergen poboljšana specifičnost postiže se upotrebom cut-off vrednosti koja je specifična za alergen, kao što je navedeno u BÜHLMANN Allergen Booklets uputstvu.

Referentni intervali su utvrđeni prema CLSI C28-A3. Sto dvadeset (120) uzoraka krvi iz centra za davaoce krvi je stimulirano stimulacionim puferom ili Anti-FcεRI mAb i testirano prema standardnim protokolima i protokolima bez pranja. Testiranje su vršila tri operatera tokom 26 dana sa dve serije Flow CAST® reagensa.

Kontrola	Protokol testiranja	Referentni interval (90% CI) [% CD63 <sup>pos</sup> ]	
		2,5-ti percentil	97,5-ti percentil
Stimulacioni pufer	standardni	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	standardni	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)

Tabela 4

## KLINIČKE PERFORMANSE

Kliničke performanse Flow CAST® evaluirane su sistematskim pregledom naučne literature. Jedanaest recenziranih studija identifikovanih u sistematskoj pretrazi literature koja pokriva vremenski period do novembra 2019, jedna studija o otrovima insekata koji nisu identifikovani u prvobitnoj pretrazi i dve studije o alergenima kikirikija objavljene nakon 2019 su uključene u analizu. Studije su ispitivale mogućnost Flow CAST®-a da diferencira osobe sa alergijskim poremećajima i osobe koje nisu alergične. Alergijski poremećaji kod alergičnih osoba potvrđeni su ili a) kliničkom istorijom pacijenta, b) oralnim unosom hrane na koju je osoba alergična (OFC) ili provokacionim testom, c) kliničkom istorijom i laboratorijskim testiranjem (prick test - SPT, slgE) ili d) kliničkom istorijom i OFC/ provokacionim testom. Studije koje su koristile slgE ili SPT kao jedinu kliničku referencu su isključene. Rezultati su sumirani u tabeli 5.

Grupa alergena	N studija	Senzitivnost medijana (opseg)	Alergične osobe (ukupno)	Specifičnost medijana (opseg)	Kontrolna grupa (ukupno)
Namirnice Inhalatorni alergeni	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Otrov insekata	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Lekovi	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Tabela 5

## KARAKTERISTIKE PERFORMANSI

### Preciznost unutar laboratorije: $\leq 25\%$ CV za stimulus

Ponovljivost (unutar serije) i preciznost unutar laboratorije utvrđeni su na osnovu CLSI smernice EP05-A3 i ISO standarda 15197:2013. Četiri uzorka krvi donora su stimulirana stimulacionim puferom ili kontrolnim anti-FcεRI mAb. Za standardnu proceduru, korišćen je dizajn studije sa 2 operatera x 4 dana x 1 serija x 4 ponavljanja. Za lyse-no-wash, primenjen je dizajn studije 2 operatera x 1 dan x 4 serije x 4 ponavljanja. Replikati odgovaraju nezavisnoj reakciji stimulacije i potpunoj proceduri analize. Rezultati za stimulacionu kontrolu anti-FcεRI mAb sumirani su u tabeli 6.

Protokol testiranja	Donor	Srednja vrednost [%CD63]	n	Unutar serije [%CV]	Između dana (A)	
					Između serija (B) [%CV]	Ukupno [%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%

Tabela 6

### Reproducibilnost: $\leq 25\%$ CV za stimulus

Reproducibilnost je ustanovljena na osnovu CLSI smernice EP05-A3 i ISO standarda 15197:2013. Četiri uzorka krvi donora su stimulirana stimulacionim puferom ili kontrolnim anti-FcεRI mAb. Uzorci su analizirani u dve laboratorije prema standardnom protokolu. Primenjen je dizajn studije 3 instrumenta/lota x 2 operatera x 1 dan x 5 ponavljanja. Replikacija odgovara nezavisnoj reakciji stimulacije i proceduri potpune analize. Rezultati za kontrolu stimulacije anti-FcεRI mAb su sumirani u tabeli 7.

Donor	Srednja vrednost [%CD63]	n	Unutar serije [%CV]	Između operatera [%CV]	Između lotova/instrumenta [%CV]	Ukupno [%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

## INTERFERIRAJUĆE SUPSTANCE

Senzitivnost Flow CAST® testa na lekove, abnormalne nalaze krvi i K-EDTA kao aditiv procenjena je prema CLSI smernicama EP07-A2. Bias u rezultatu veći od 20% za stimulacionu kontrolu anti-FcεRI mAb i 20% CD63<sup>pos</sup> (apsolutno) za stimulacionu kontrolu fMLP smatrana je interferencijom. Pri navedenim koncentracijama nisu detektovane interferencije sa supstancama navedenim u tabeli 8, u navedenim koncentracijama. Interferencija je detektovana sa K-EDTA pri dvostrukoj koncentraciji K-EDTA u epruveti za venepunkciju za jednog donora.

Aktivna komponenta	Test koncentracija [µg/mL]
Feksofenadin hidrohlorid	1,6
Cetirizin dihidrohlorid	4,35
Hidroksizin dihidrohlorid	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednizon	1,2
N-acetil-L-triptofan	30
Trigliceridi (Intralipid)	20 000
Bilirubin konjugovan	400
Bilirubin nekonjugovan	400
Hemoliza	56 100

Tabela 8

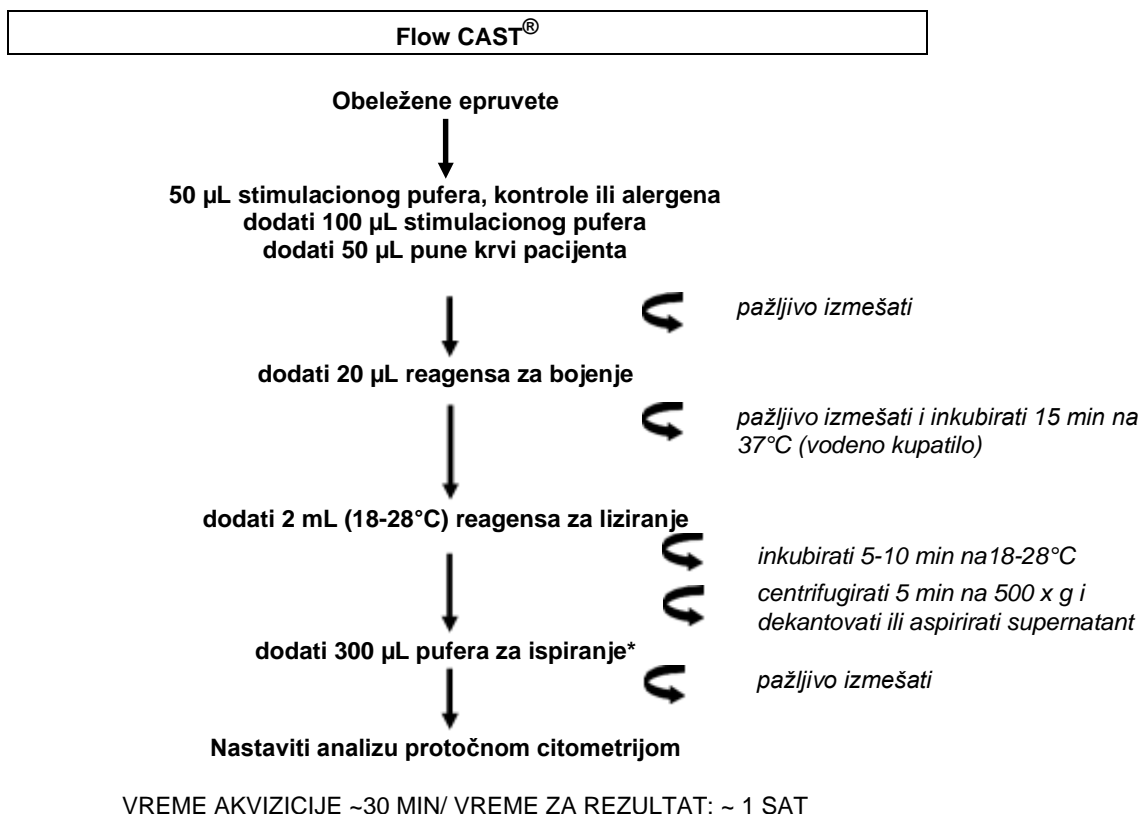


---

## REFERENCE

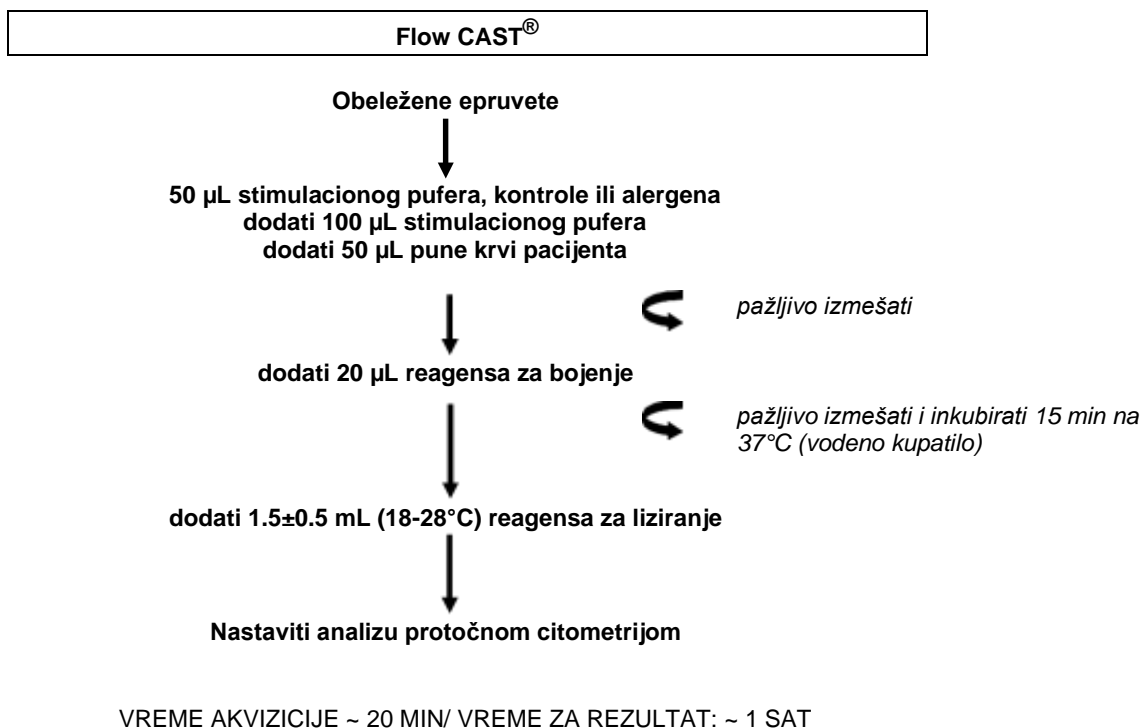
1. Sainte-Laudy, J, et al. [Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis]. *Allerg Immunol (Paris)* 26, 211-4. (1994).
2. Sabbah, A and Sainte-Laudy, J. Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation. *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. DeWeck, 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).

**OPCIJA A: STANDARDNI PROTOKOL: LIZIRANJE I PRANJE (LYSE AND WASH)**



\* Napomena: U zavisnosti od protočnog citometra koji se koristi, količinu pufera za ispiranje treba prilagoditi u odnosu na mrtvu zapreminu i gustinu ćelija kompatibilnu sa instrumentom.

**OPCIJA B: ALTERNATIVNI PROTOKOL: LIZIRANJE BEZ ISPIRANJA (LYSE-NO-WASH PROTOKOL)**



---

**LOG IZMENA**

Datum	Verzija	Izmena
2023-06-21	A2	Revizija odeljka <i>analiza podataka i kliničke performanse</i> Uključivanje broja notifikovanog tela CE znaku – postupak ocenjivanja usaglašenosti u skladu sa IVDR 2017/746

---

**IZVEŠTAVANJE O INCIDENTIMA U ZEMLJAMA EU**

Ako se desio bilo kakav ozbiljan incident u vezi sa ovim medicinskim sredstvom, molimo da ga bez odlaganja prijavite proizvođaču i nadležnom organu svoje države članice EU.

---

**OŠTEĆENJE PRILIKOM TRANSPORTA**

Ukoliko ste proizvod primili u oštećenom stanju, molimo da kontaktirate svog distributera.

## SIMBOLI

BÜHLMANN koristite simbole i znae navedene i opisane u ISO 15223-1. Pored toga, koriste se sledeći simboli i znaci:

Simbol	Objašnjenje
BUF   STIM	Stimulacioni pufer
CONTROL   STIM	Stimulaciona kontrola
CONTROL   FMLP	Stimulaciona kontrola fMLP
REAG   STAIN	Reagens za bojenje
REAG   LYS	Reagens za liziranje
BUF   WASH	Pufer za ispiranje

