



# Flow CAST<sup>®</sup>

Basofilaktiveringstest (BAT)  
Flödescytometri

För *in vitro*-diagnostisk användning

FK-CCR 100 tester

Utgivningsdatum: 2023-06-21  
Version A2



**BÜHLMANN Laboratories AG**

Baselstrasse 55

4124 Schönenbuch, Switzerland

Tel.: +41 61 487 1212

Fax: +41 61 487 1234info@buhlmannlabs.ch



## AVSEDD ANVÄNDNING

BÜHLMANN Flow CAST® är ett *in vitro-diagnostiskt test* för kvantitativ bestämning av basofilaktivering vid stimulering med specifika allergener. Testet använder flödescytometri för att detektera basofilpopulation som uttrycker CD63-cellytmarkörer i K-EDTA-helblodprov från patient. Flow CAST® är avsett som ett hjälpmedel för diagnosticering av omedelbara allergiska tillstånd i kombination med andra kliniska fynd och laboratorieprover. Endast för användning i laboratorium.

## ANALYSENS PRINCIP

Flow CAST® är ett basofilaktiveringstest baserat på flödescytometri (ref. 1, 2). Helblod från patienter stimuleras med specifika allergener och med stimuleringsbuffert samt stimuleringskontroller för att utvärdera patientens basofildegranulering *ex vivo*. Provet färgas med två fluorescensmärkta monoklonala antikroppar, en för basofilselektering (anti-CCR3-PE) och en för bestämning av basofilaktivering (anti-CD63-FITC) (ref. 3-6). CD63 är ett transmembranprotein som finns på cellytan hos intracellulära vesiklar efter basofildegranulering (ref. 7). Erythrocyter från patientprov avlägsnas genom en lyseringsreaktion. Beroende på protokoll centrifugeras cellerna, återsuspenderas i tvättbuffert och fixeras för senare analys med flödescytometri, eller analyseras direkt efter lysering. Basofiler grindas från leukocytpopulationen som CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>low</sup>. Aktiveringsstatus för de grindade basofilerna bestäms av deras CD63-uttryck (aktiveringsmarkör). Patienter hos vilka IgE-medierade allergiska reaktioner inte framkallas, så kallade "icke-responders" identifieras baserat på resultaten av de positiva kontrollerna. För avläsning av analysen används ratiot mellan CD63-positiva basofiler och totala basofiler (% CD63-aktivering).

## REAGENSER SOM MEDFÖLER OCH FÖRBEREDELSE

Reagenser	Mängd	Kod	Kommentar
<b>Stimuleringsbuffert</b> innehållande kalcium, heparin och IL-3	1 flaska frystorkad	B-CCR-STB	Rekonstituera med 50 mL vatten <sup>1)</sup>
<b>Stimuleringskontroll</b> anti-FcEpsilonRI mAb	1 flaska frystorkad	B-CCR- STCON	Rekonstituera med 1,5 mL B-CCR-STB
<b>Stimuleringskontroll</b> fMLP <sup>2)</sup>	1 flaska frystorkad	B-CCR-FMLP	Rekonstituera med 1,5 mL B-CCR-STB
<b>Färgningsreagens</b> Blandning av anti-CD63-FITC och anti-CCR3-PE mAb	1 flaska 2,2 mL	B-CCR-SR	Bruksfärdig
<b>Lyseringsreagens<sup>3)</sup></b> 10 x koncentrerad	1 flaska 25 mL	B-CCR-LYR	Späd med 225 mL avjoniserat vatten
<b>Tvättbuffert</b> med 0,1% formaldehyd	1 flaska 100 mL	B-CCR-WB	Bruksfärdig

Tabell 1

<sup>1)</sup> Se avsnitt Tekniska försiktighetsåtgärder för rekommenderad vattenkvalitet.

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

<sup>3)</sup> Kristaller kan bildas under förvaring vid 2–8 °C. Sådana bör lösas upp vid 18–28 °C före spädning

## FÖRVARING OCH HÅLLBARHET FÖR REAGENSER

Öppnade reagenser	
Förvaras vid 2–8 °C. Använd inte reagenserna efter det utgångsdatum som är tryckt på etiketterna.	
Öppnade och rekonstituerade reagenser	
Stimuleringsbuffert	Stabil vid –20°C i 6 månader. Vid upprepade användning förväntas alikvot.
Stimuleringskontroll	
Stimuleringskontroll fMLP	
Lyseringsreagens	Stabil vid 2–8°C i 6 månader.
Färgningsreagens	
Tvättbuffert	

Tabell 2

## MATERIAL SOM BEHÖVS, MEN INTE INGÅR

- K-EDTA-venprovtagningsrör
- Centrifug
- Pyrogenfria flödescytometrirör av polypropylen eller polystyren för engångsbruk
- Provrörställ för flödescytometri, för stimuleringen
- Vortexblandare
- (Ej obligatoriskt) Mikrotiterplattor för vävnadsodling, för cellstimulering och färgningen enligt standardprotokollet
- (Ej obligatoriskt) Djupbrunnplattor för cellstimulering, färgning, lysering och flödescytometrisk datainsamling enligt lysering-ingen-tvätt-protokollet
- Precisionspipetter med pyrogenfria spetsar för engångsbruk
  - 10-100 µL, 100-1000 µL,
  - 1-5 mL justerbar pipett och
  - (ej obligatoriskt): 10-50 µL justerbar dispenser
- 50 mL cylinder för rekonstituering av stimuleringsbufferten
- Sterilt, ultrarent och apyrogen vatten för rekonstituering av stimuleringsbufferten (se avsnitt Tekniska försiktighetsåtgärder)
- Vattenbad (rekommenderas) eller inkubator inställd på 37 °C
- Destillerat eller avjoniserat vatten och lämpligt laboratorieglas för utspädning av lyseringsreagenserna
- Lock eller parafilm för övertäckning av rören under inkubationsstegen
- Flasktoppdispensers för lyseringen av reagens och tvättbuffert
- Flödescytometer utrustad med en 488 nm (blå) laserkälla och emissionsfilter för PE- samt FITC-detektering
- Programvara för flödescytometrisk analys (se avsnitt Flödescytometrisk datainsamling)

## ALLERGENER SOM SKA BESTÄLLAS SEPARAT

Validerade antigener för Flow CAST® tillhandahålls separat av BÜHLMANN. För beställningskoder och information om preperation av allergener se BÜHLMANN's allergen-material på BÜHLMANN's webbsida:

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

**Viktigt:** Flow CAST® har endast testats i kombination med de CAST®-allergener som finns tillgängliga via BÜHLMANN Laboratories AG. Det är laboratoriets eget ansvar att validera användningen av allergener som erhålls från andra källor.

## VARNINGAR

### Säkerhetsåtgärder

- Stimuleringsbufferten (B-CCR-STB) i detta test innehåller komponenter av mänskligt ursprung. Även om reagenserna har testats och uppvisat negativa resultat för HBV-ytantigen och HCV- samt HIV1/2-antikroppar, ska de hanteras som potentiellt smittsamma i enlighet med god laboratorised (GLP) och lämpliga försiktighetsåtgärder ska vidtas.
- Undvik att reagenserna kommer i kontakt med hud, ögon, eller slemhinnor. Vid kontakt, skölj omedelbart med rikliga mängder vatten.
- Reagenser och kemikalier ska hanteras som farligt avfall i enlighet med nationella riktlinjer eller lagstiftning.

### Tekniska försiktighetsåtgärder

- Rekommenderad vattenkvalitet för Flow CAST®: Användning av sterilt, ultrarent och apyrogen vatten för rekonstituering av stimuleringsbuffert (B-CCR-STB) är avgörande för god och reproducerbar basofilstimulering. Följande vattenkällor kan användas: vatten av cellodlingskvalitet, vatten av infusionskvalitet eller avjoniserat, dubbeldestillerat vatten som ultrafiltrerats i ett periodiskt sanerat 10 kDa ultrafilter.
- Lyseringsreagens (B-CCR-LYR) kan rekonstitueras med avjoniserat, dubbeldestillerat vatten eller med vatten som har samma kvalitet som det vatten som används för rekonstituering av stimuleringsbufferten.
- Undvik allergenkontaminering under cellstimulering: Luftallergener i laboratoriet kan förorena öppna blodprover samt cellsuspensioner och orsaka förhöjd bakgrundsnivå. Blodprover och rör för cellstimulering måste täckas väl med lock eller parafilm. Undvik husdammkvalster, pollinerande växter, latexhandskar och utrustning som kan innehålla latex samt öppna fönster i laboratoriet där cellstimuleringen utförs. Det rekommenderas att cellpreparation- och stimuleringssteg utförs i en laminär flödesdshuv.
- Vattenbad rekommenderas framför inkubator på grund av effektivare värmeöverföring. Kontrollera att temperaturen är inställd på 37° C om inkubator används. Lägre eller högre temperatur kan påverka resultatet.
- Låg nivå av basofilaktivering förväntas generellt för läkemedelsallergener. Det är därför avgörande att optimala förhållanden under stimulering uppnås, inklusive temperatur. För läkemedelsallergener rekommenderas användning av enstaka rör istället för djupbrunnplattor.
- Komponenterna får inte användas efter utgångsdatumet som är tryckt på etiketterna.
- Blanda inte reagenser från olika loter.
- Undvik kontaminering av reagenser.

### Testprocedur

- Balansera lyseringsreagens till rumstemperatur (18–28 °C).
- Läs instruktionerna noga innan testet utförs. Testets prestanda kan påverkas negativt om reagensen späds

på felaktigt sätt, eller hanteras och förvaras under andra förhållanden än de som anges i denna bruksanvisning.

- Prov som inte hanteras korrekt kan ge felaktiga resultat.
- Verifiera preparaten visuellt för att bedöma effekten av lyseringen. Erytrocyterna kan lyseras ofullständigt och uppträda som ljus diffraktion på samma plats som leukocyterna i punktdiagrammet.
- Förlängd lyseringstid kan leda till cellförlust. Säkerställ att minst 300 basofiler finns för datainsamling. Vi rekommenderar att insamling av prover som hanteras enligt lysering-ingen-tvätt-protokollet utförs inom en timme.
- Flödescytometri kan ge falska resultat om: cytometern är felinställd, fluorescensläckor inte kompenseras tillräckligt, eller om grindregionerna inte placeras med noggrannhet.

## PROVINSAMLING OCH LAGRING

Det rekommenderas att patienter undviker systemiskt administrerade antiallergena läkemedel såsom kortikosteroider och kromoglycinsyra (DSCG) under minst 24 timmar före blodprovstagning.

Samla blod i K-EDTA-venprovtagingsrör genom att fylla rören upp till avsett volymmärke. Rören måste fyllas minst halvvägs. En (1) mL helblod räcker till cirka 18 provrör.

**Blodproverna ska inte centrifugeras eller frysas.**

### Helblod

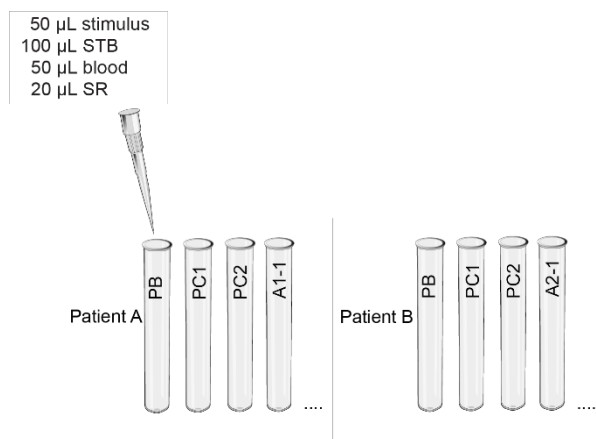
Helblodprov som förvaras vid 2–8 °C bör bearbetas inom 48 timmar efter insamlingen. För bestämning av allergiska reaktioner mot läkemedel rekommenderas att proverna bearbetas omedelbart och senast 24 timmar efter provinsamling. Helblodprov kan också lagras vid rumstemperatur (temperaturer upp till 28 °C). De måste dock bearbetas inom 24 timmar efter insamlingen enligt standardprotokollet, eller på insamlingsdagen enligt lysering-ingen-tvätt-protokollet.

### Bearbetade prov

Celler som bearbetas enligt standardprotokollet fixeras. Fixerade celler kan förvaras vid 2–8 °C i 5 dagar i skydd från ljus för efterföljande flödescytometrisk provinsamling.

## ANALYSPROCEDUR

1. Blanda det icke koagulerade blodprovet genom att vända venpunkturnröret upp och ner flera gånger.
2. Förbered nya och pyrogenfria standardcytometrör av polypropen eller polystyren.
3. Märk rören för varje patient t.ex. enligt följande:  
PB = patientbakgrund  
PC1 = stimuleringskontroll med anti-FcEpsilonRI-Ab  
PC2 = stimuleringskontroll med fMLP  
A1-1 för allergen 1 med spädning 1  
A1-2 för allergen 1 med spädning 2 etc.



## Stimulering och färgning

- Tillsätt 50 µL av motsvarande stimuli till varje rör:  
PB-rör: 50 µL **stimuleringsbuffert** (patientbakgrund)  
PC1-rör: 50 µL **stimuleringskontroll** anti-FcEpsilonRI mAb  
PC2-rör: 50 µL **stimuleringskontroll** fMLP  
Ax-y-rör: 50 µL **allergen**
- Tillsätt 100 µL **stimuleringsbuffert** (STB) till varje rör.
- Tillsätt 50 µL av patientens helblod till varje rör. Säkerställ att sidan av röret och toppen är fri från blod.
- Blanda med försiktighet.
- Tillsätt 20 µL färgningsreagens (SR) till varje rör.
- Blanda med försiktighet, täck rören och inkubera i 15 minuter vid 37 °C i **vattenbad**.

**Obs:** Om inkubator används istället för vattenbad förlängs inkubationstiden till 25 minuter på grund av mindre effektiv värmeöverföring.

## Lysering

**Obs:** Lyseringsreagensen måste balanseras till rumstemperatur (18–28 °C).

### Standardprotokoll: Lysering och tvätt

- Tillsätt 2 mL balanserat (18–28 °C) lyseringsreagens till varje rör, blanda med försiktighet.
- Inkubera i 5-10 minuter vid 18–28 °C.
- Centrifugera rören i 5 minuter vid 500 x g.
- Dekantera supernatanten med hjälp av blottingpapper.
- Återsuspendera cellpelleten med 300 µL tvättbuffert (ett fixativ inkluderas i tvättbufferten).

**Obs:** Mängden tvättbuffert kan anpassas till det specifika flödescytometriska instrument som används utifrån den dödvolum och celldensitet som är kompatibel med enheten.

- Vortexblanda med försiktighet.

**Följ antingen** 16a.: använd proverna för datainsamling med flödescytometern.

**eller** 16b.: om proverna inte används för omedelbar datainsamling, låt dem inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur och i skydd från ljus (fixerade). Förvara proverna förseglade i skydd från ljus vid 2–8 °C fram till mätning. Fixerade celler kan förvaras vid 2–8 °C i 5 dagar för efterföljande flödescytometrisk datainsamling. Vortexblanda provrören med försiktighet före datainsamling.

**Obs:** Lagrade prover som är fixerade kan när som helst analyseras utan förbehandling. Se avsnittet "Provinsamling

och lagring" för förvaringsstider. En viss minskning av fluorescensintensiteten och en lägre basofiltillväxt  $\geq 80\%$  kan observeras efter längre tids lagring.

### Alternativt protokoll: "Lysering-ingen-tvätt"

Den nya generationens högpresterande flödescytometrar kan analysera lyserade, otvättade prover. Denna procedur måste anpassas till det flödescytometerska instrument som används och kan kräva optimering. Protokollet nedan är baserat på data som erhållits med Attune NxT-flödescytometer (Thermo Fisher).

- Utför procedursteg 1 till 9 (ovan) och fortsätt sedan med steg 10 här. Tillsätt  $1,5 \pm 0,5$  mL balanserat (18–28 °C) lyseringsreagens till varje rör och blanda med försiktighet (volymen måste optimeras beroende på hastigheten hos den använda flödescytometern).
- Samla in datan med hjälp av lämplig flödescytometrisk enhet som möjliggör hög hastighet för att hålla analystiden minimal.

**Obs:** Datan bör analyseras inom 24 timmar efter insamling. Se avsnittet "Provinsamling och lagring".

## FLÖDESCYTOTETRISK DATAINSAMLING

Flödescytometrisk datainsamling kan utföras på flödescytometer som är utrustad med en 488 nm argonlaserdiod (blågrönt excitationsljus).

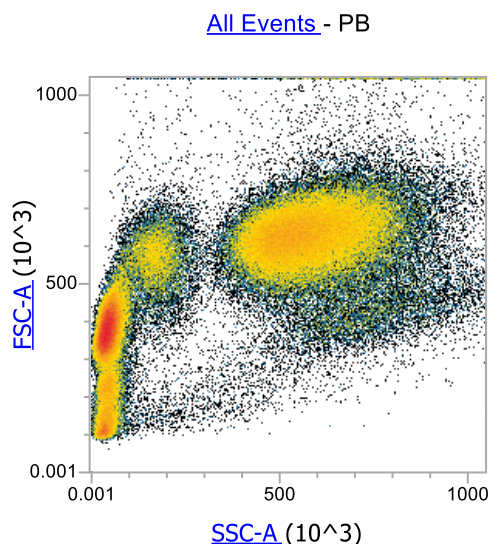
Flödescytometern måste vara optimerad för detektering av Forward Scatter (FSC) och Side Scatter (SSC) samt de två fluorokromerna FITC och PE.

Säkerställ att flödescytometern är korrekt inställd och färgkompenserad. För lämplig datainsamling och karakterisering av vilande samt aktiverade basofiler skapas följande punktdiagram:

- Skapa punktdiagram 1 som FSC kontra SSC för insamling av full leukocytpopulation, som visas i figur 1. Säkerställ att leukocytpopulationen separeras i tre åtskilda populationer (lymfocyter, monocyter och granulocyter) på FSC/SSC-punktdiagrammet under insamlingen. Justera FSC- och SSC-signalerna (grindningen) för att få en fördelning som visas i figur 1. Se flödescytometers produktmanual för ytterligare instruktioner.
- Skapa punktdiagram 2 som CCR3-PE kontra SSC, som visas i figur 2. Ställ in en grindning (t.ex. basofiler) inkluderande hela basofilpopulationen som är CCR3<sup>pos</sup> och SSC<sup>low</sup>, som visas med rektangeln i figur 2. Eosinofiler som är CCR3<sup>pos</sup> måste uteslutas baserat på hög SSC.
- Skapa punktdiagram 3 som CD63-FITC kontra CCR3-PE med endast de grindade basofilerna, som visas i figur 3. Använd de icke-stimulerade, vilande basofilerna i patientens provrör (PB) för att skapa en kvadrantgrindning inkluderande CD63-negativa basofilceller i den nedre högra kvadranten (CD63<sup>neg</sup> CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>lag</sup>), som visas i figur 3. Basofiler aktiverade genom stimulering av positiva kontroller och specifika allergener kommer att resultera i CD63-positiv basofilpopulation (CD63<sup>pos</sup>/CCR3<sup>pos</sup>/SSC<sup>lag</sup>) identifierad i den övre högra kvadranten, som visas i figur 4 med ett exempel på positiv kontrollstimulering (STCON).

För avläsning av analysen används ratiot mellan CD63-positiva basofiler och totala basofiler (%CD63-aktivering)

som identifierats i kvadrantgrindningen i punktdiagram 3 för något av stimuleringsrören.

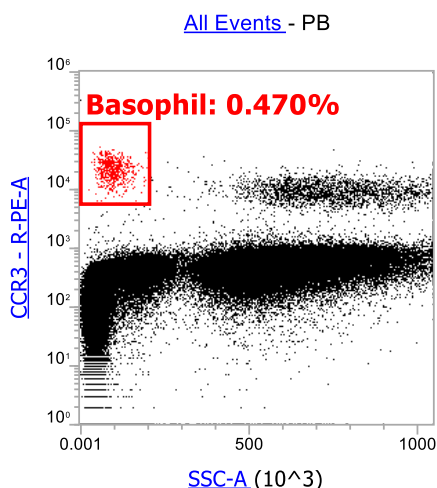


Figur 1: Tre åtskilda populationer (lymfocyter, monocyter och granulocyter) på ett FSC/SSC-punktdiagram.

Samla in 500 basofilceller eller fler för varje stimuleringsrör (grindade enligt punktdiagram 2, som visas i figur 2 nedan). Testresultaten kan inte utvärderas om färre än 300 basofilceller samlas in (t.ex. vid basopeni).

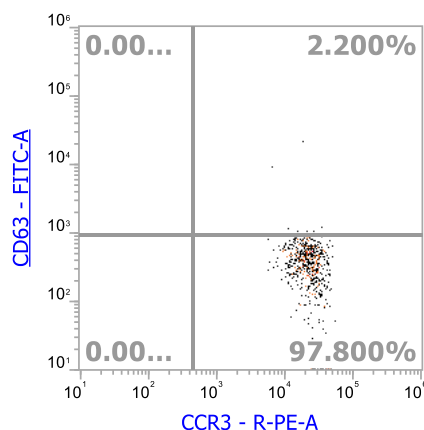
## DATAANALYS

Insamlade data analyseras med lämplig programvara för flödescytometrisk analys. Liknande punktdiagram och grindning som för insamlade data skapas. Grindningen som identifierar basofilerna i punktdiagram 2 kan anpassas individuellt i de olika stimuleringsrören för ett och samma patientprov. För korrekt utvärdering och standardisering av resultaten måste en bakgrundsinställning sättas upp för varje enskild patient med hjälp av patientens bakgrundsstimulering (PB). Kvadrantgrindningen som skapas i punktdiagram 3 måste ställas in utifrån bakgrundsstimuleringen (PB). För standardisering av analysen är grindningen inställd på att vara mellan 2 och 2,5% aktiverade basofiler i PB-provet hos varje patient (se figur 3). Denna grindning måste appliceras på alla efterföljande stimuleringar för samma patienter (PC1, PC2 och alla analyserade allergener) för att beräkna procentandelen CD63-positiva celler i stimuleringsrören (se figur 4).



Figur 2: Selektion av basofila celler CCR3<sup>pos</sup> / SSC<sup>låg</sup>

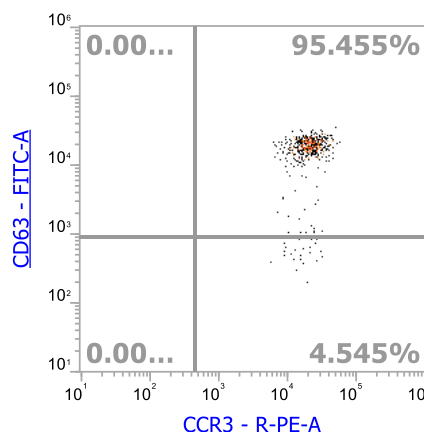
## Basophil - PB



Grindad region	Antal (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: Patientbakgrund (PB) med endast STB

## Basophil - PC



Grindad region	Antal (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

Följande kriterier och kvalitetskontrollåtgärder bör uppfyllas för ett giltigt resultat:

**Leukocytpopulationer:** Generellt bör tre distinkta leukocytpopulationer, lymfocyter, monocyter och granulocyter, urskiljas i FSC/SSC-diagrammet (se figur 1). Populationernas förekomst kan betraktas som ett kriterium för blodprovets kvalitet (förfluten tid mellan provinsamling och utförande av analys samt lagringsförhållanden). Testresultaten kan inte utvärderas om färre än 300 basofiler samlas in.

**Stimulerings- (positiva) anti-FcEpsilonRI mAb - och fMLP kontroller:** anti-FcEpsilonRI mAb efterliknar receptorbindningen hos allergenen *in vivo*. fMLP är en

tripeptid som aktiverar basofilerna på ett icke-immunologiskt sätt.

- Om anti-FcEpsilonRI mAb-kontrollen visar ett värde på  $\geq 10\%$  aktiverade basofiler kan proverna utvärderas.
- Om fMLP-kontrollen visar en signal på  $\geq 10\%$ , men anti-FcEpsilonRI mAb inte gör det, har analysen utförts korrekt, men testresultat kan inte utvärderas. Patienten anses vara en IgE-”icke-responder”.
- Om både anti-FcEpsilonRI mAb och fMLP visar värden på  $< 10\%$  aktiverade basofiler är ett tekniskt fel sannolikt. Testresultatet bör betraktas som ogiltigt och testet göras om.

## STANDARDISERING

Flow CAST® detekterar population av basofiler som uttrycker CD63-cellernas ytmarkör som % av totala antalet basofiler. Det finns inga internationellt eller nationellt erkända referensmaterial eller referensförfaranden för denna analyt.

Batch-till-batch-reproducerbarhet garanteras genom titrering av anti-CD63-FITC- och anti-CCR3-PE-monoklonala antikroppskonjugat mot kalibreringsgranulat. För en uppskattning av batch-till-batch-variation, se reproducerbarhetsresultaten i avsnitt "Prestandaegenskaper".

## BEGRÄNSNINGAR

- Flow CAST®-testresultat bör tolkas i kombination med andra kliniska fynd och laboratorieprover.
- För att fastställa läkemedelsrelaterade allergiska tillstånd bör BAT-test göras inom 6 månader efter den allergiska reaktionen (ref. 8).
- Säkerställ att BAT-test görs minst en till två veckor efter en allergisk reaktion (ref. 8).
- Negativa resultat som erhålls för läkemedelsallergener bör inte användas för uteslutning av allergi.
- Av patienterna förväntas 5 till 10% vara IgE-”icke-responders”. Uppreglering av CD63-uttryck och positivt resultat kommer inte att observeras för dessa patienter. ”Icke-responders” kan identifieras med hjälp av stimuleringskontrollerna som medföljer Flow CAST®-testet (ref. 9).
- Otillräckligt fyllda K-EDTA-rör (mindre än halvfyllda) kan leda till falskt negativa resultat.
- Interferens med Flow CAST-testresultat® förväntas för patienter som behandlas med omalizumab (XOLAIR®) (ref. 10).
- Systemiskt administrerade antiallergena läkemedel såsom kortikosteroider och kromoglycinsyra (DSCG) bör undvikas under minst 24 timmar före blodprovstagning.

## TOLKNING AV RESULTAT

Flow CAST®-resultatkategorier:

Resultat	Tolkning
$<$ cut-off (gränsvärde)	negativ
$\geq$ cut-off (gränsvärde) för en eller båda allergen-spädningarna.	positiv

Tabell 3

## CUT-OFF OCH REFERENSINTERVALL

Ett teknisk gränsvärde på 5% aktiverade basofiler har fastställts där resultat  $\geq 5\%$  CD63<sup>pos</sup> indikerar basofilaktivering.

För varje allergen uppnås förbättrad specificitet genom användning av de allergenspecifika gränsvärden som anges i BÜHLMANN's allergen-material.

Referensintervall fastställdes enligt CLSI C28-A3. Etthundratjugo (120) blodprover från en blodgivningscentral stimulerades med stimuleringsbuffert eller anti-FcEpsilonRI mAb och testades enligt standard- och lysering-ingen-tvätt-protokoll. Testningen utfördes under 26 dagar av tre operatörer med två loter Flow CAST®-reagenser.

Kontroll	Analys-protokoll	Referensintervall (90% KI) [% CD63 <sup>pos</sup> ]	
		2,5:e percentilen	97,5:e percentilen
Stimuleringsbuffert	standard	0,8 (0,5 - 1,2)	4,6 (4,1 - 6,4)
	lysering-ingen-tvätt	0,9 (0,6 - 1,0)	4,2 (3,9 - 5,3)
anti-FcEpsilonRI mAb	standard	18,0 (11,5 - 26,0)	97,7 (96,0 - 98,5)
	lysering-ingen-tvätt	13,2 (11,4 - 21,2)	96,4 (94,3 - 97,3)

Tabell 4

## KLINISK PRESTANDA

Klinisk prestanda av Flow CAST® utvärderades i en systematisk vetenskaplig litteraturoversikt. I analysen inkluderades elva fackgranskade studier identifierade i en systematisk litteratursökning som täckte en tidsperiod fram till november 2019, en studie på insektsgift som inte identifierades i den ursprungliga sökningen och två studier på jordnötsallergener som publicerades efter 2019. Studierna undersökte Flow CAST®-testets förmåga att särskilja deltagare med allergiska sjukdomar från icke allergiska deltagare. Allergisk sjukdom hos deltagarna bekräftades av a) patientens kliniska historia, b) födoämnesprovokation (OFC) eller provokationstest, c) klinisk historia och laboratorieprover (pricktest - SPT, slgE) eller d) klinisk historia och OFC/provokationstest. Studier med slgE eller SPT som enda kliniska referens exkluderades. Resultaten sammanfattas i tabell 5.

Allergen-grupp	N studier	Känslighetsmedian (intervall)	Allergiska deltagare (total)	Specificitetsmedian (intervall)	Kontroll-deltagare (total)
Mat Inhalationsmedel	5	92% (81-100%)	311	93% (80-100%)	240
Insektsgift	2	87% (73-89%)	79	96% (95-97%)	39
Läkemedel	7	55% (0-68%)	227	91% (79-100%)	167

Tabell 5

## PRESTANDAEGENSKAPER

### Inom-laboratorie-precision: $\leq 25\%$ CV för stimuli

Repetierbarhet (inom-körning) och inom-laboratorie-precision fastställdes enligt CLSI-guideline EP05-A3 och ISO standard 15197:2013. Fyra donatorblodprover stimulerades med stimuleringsbuffert eller stimuleringskontrollen anti-FcEpsilonRI mAb. För standardproceduren användes en studiedesign med 2

operatorer x 4 dagar x 1 körning x 4 replikat. För lysering-ingen-tvätt tillämpades en studiedesign med 2 operatörer x 1 dag x 4 körningar x 4 replikat. Ett replikat motsvarade en oberoende stimuleringsreaktion och en fullständig analysprocedur. Resultaten för stimuleringskontrollen anti-FcEpsilonRI mAb sammanfattas i tabell 6.

Analys-protokoll	Donator	Medel [%CD63]	n	Inom-körning [%CV]	Inom-dag (A) Mellan-körning (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%
lysering-ingen-tvätt (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%	1,5%	1,5%
	H	73,9	32	3,3%	2,9%	5,2%

Tabell 6

### Reproducerbarhet: $\leq 25\%$ CV för stimuli

Reproducerbarheten fastställdes enligt CLSI-guideline EP05-A3 och ISO standard 15197:2013. Fyra donatorblodprover stimulerades med stimuleringsbuffert eller stimuleringskontrollen anti-FcEpsilonRI mAb. Proverna analyserades på två laboratorieplatser enligt standardprotokollet. En studiedesign med 3 instrument/loter x 2 operatörer x 1 dag x 5 replikat tillämpades. Ett replikat motsvarade en oberoende stimuleringsreaktion och en fullständig analysprocedur. Resultaten för stimuleringskontrollen anti-FcEpsilonRI mAb sammanfattas i tabell 7.

Donor	Medel [%CD63]	n	Inom-körning [%CV]	Mellan-operatör [%CV]	Mellan-lot/instrument [%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

## INTERFERERANDE SUBSTANSER

Känsligheten hos Flow CAST®-analysen för läkemedel, avvikande blodförhållanden och K-EDTA-provtillsatsen bedömdes enligt CLSI-guideline EP07-A2. Systematiskt fel i resultat som översteg 20% för stimuleringskontrollen anti-FcEpsilonRI mAb och 20% CD63<sup>pos</sup> (absolut) för stimuleringskontrollen fMLP ansågs som interferens. Ingen interferens detekterades vid de angivna koncentrationerna med ämnena som presenteras i tabell 8. För en donator detekterades interferens med K-EDTA vid dubbel K-EDTA venprovvrörskoncentration.

Aktiv komponent	Testkoncentration [µg/mL]
Fexofenadinhydroklorid	1,6
Cetirizindihydroklorid	4,35
Hydroxyzindihydroklorid	0,27
Ketotifen	0,6
Montelukast	3,84
Prednison	1,2
N-acetyl-L-tryptofan	30
Triglycerid (Intralipid)	20000
Konjugerat bilirubin	400
Okonjugerat bilirubin	400
Hemolys	56100

Tabell 8



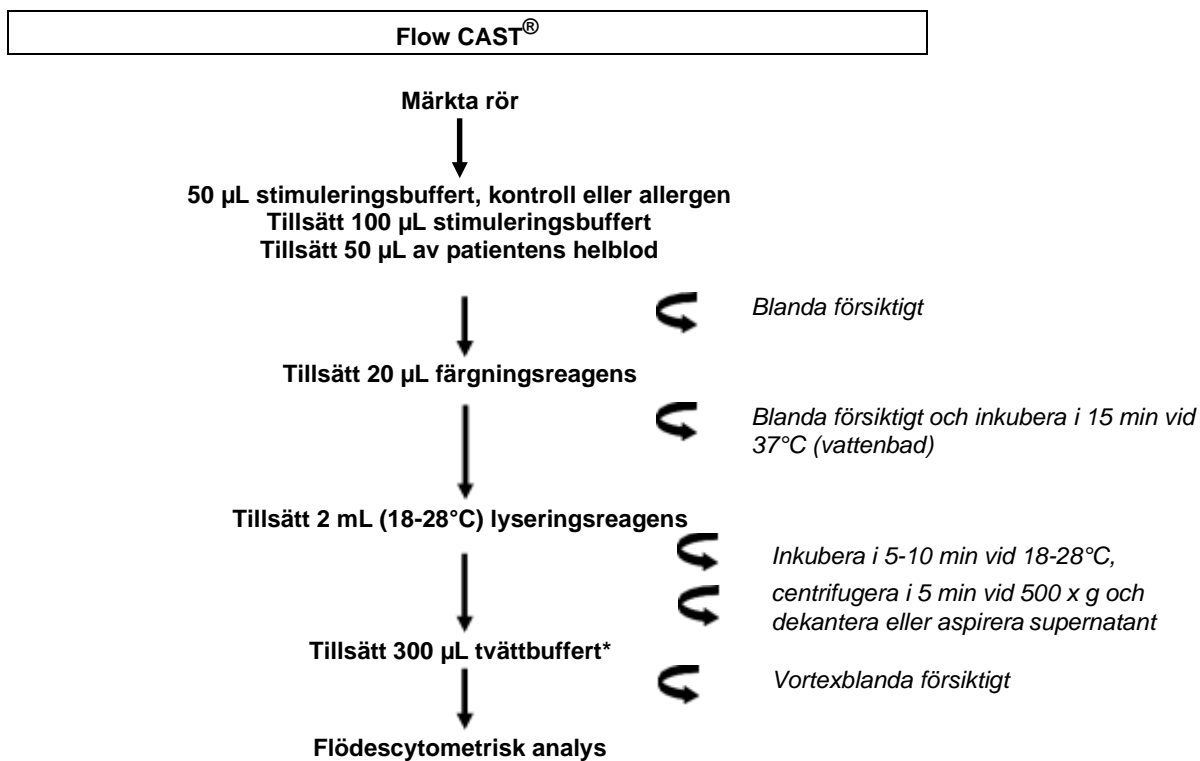
---

## REFERENSER

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).

## KORT PROTOKOLL

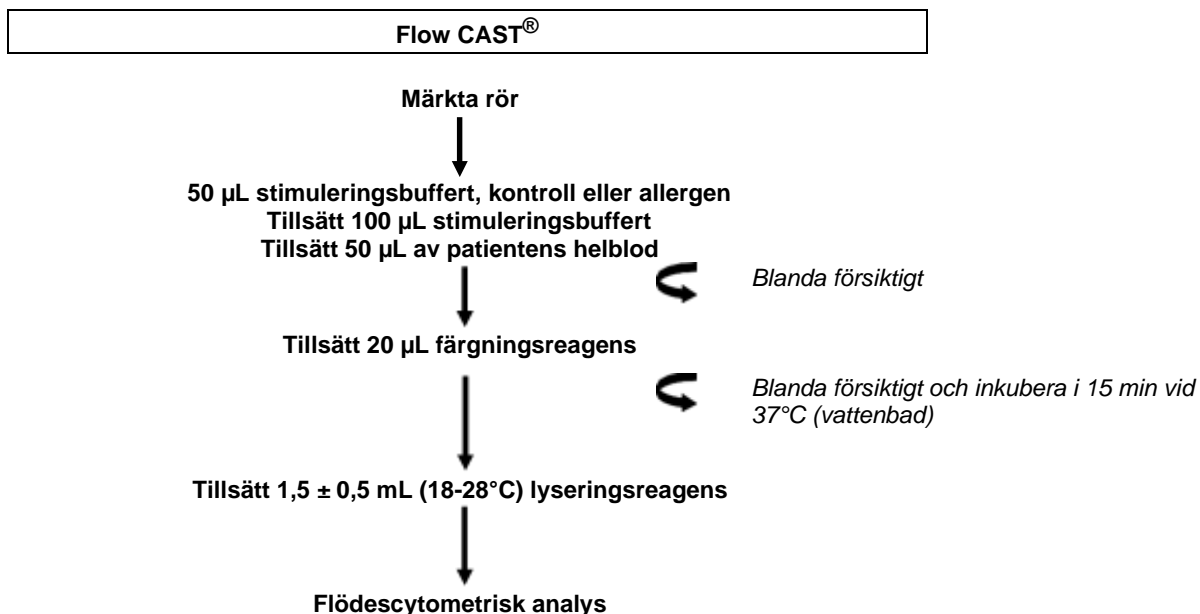
### STANDARDPROTOKOLL: LYSERING OCH TVÄTT



TID TILL INSAMLING: ~ 30 MIN/TID TILL RESULTAT: ~ 1 TIMME

\* Obs: Beroende på vilket flödescytometriskt instrument som används bör mängden tvättbuffert anpassas utifrån den dödvolymp och celldensitet som är kompatibel med instrumentet.

### ALTERNATIVT PROTOKOLL: LYSERING-INGEN-TVÄTT



TID TILL INSAMLING: ~ 20 MIN/TID TILL RESULTAT: ~ 1 TIMME

---

## ÄNDRINGSLOGG

Datum	Version	Ändring
2023-06-21	A2	Omformulering av avsnitt <i>Dataanalys</i> och <i>Klinisk prestanda</i> Inkludering av anmält organs identifieringsnummer till CE-märkning – bedömning av överensstämmelse i enlighet med IVDR 2017/746

---

## INCIDENTRAPPORTERING I EU-MEDLEMSSTATER

Om någon allvarlig incident i samband med denna enhet har inträffat, ska detta rapporteras utan dröjsmål till tillverkaren och behörig myndighet i ditt medlemsland.

---

## FRAKTSKADA

Meddela din distributör om denna produkt mottogs skadad.

## SYMBOLER

BÜHLMANN använder symboler och märkning som beskrivs i ISO 15223-1. Dessutom används följande symboler och tecken:

Symbol	Förklaring
BUF   STIM	Stimuleringsbuffert
CONTROL   STIM	Stimuleringskontroll
CONTROL   FMLP	Stimuleringskontroll fMLP
REAG   STAIN	Färgningsreagens
REAG   LYS	Lyseringsreagens
BUF   WASH	Tvättbuffert

