



Flow CAST[®]

Test d'activation des basophiles (TAB) Cytométrie en flux

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*

FK-CCR 100 tests

Date de publication : 2022-05-23
Version A1



BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Suisse
Tél.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhmannlabs.ch

UTILISATION PREVUE

Le test de diagnostic *in vitro* BÜHLMANN Flow CAST® permet l'évaluation qualitative de l'activation des basophiles suite à stimulation avec des allergènes spécifiques. Le test utilise la cytométrie en flux pour déterminer la population de basophiles exprimant un marqueur de surface cellulaire CD63 dans des échantillons de sang total plus K-EDTA de patients. Le dosage Flow CAST® est destiné à aider au diagnostic des troubles allergiques de type immédiat en conjonction avec d'autres résultats cliniques et analyses de laboratoires.

Pour utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU TEST

Le dosage Flow CAST® est un test d'activation des basophiles basé sur la cytométrie en flux (réf. 1, 2). Le sang total des patients est stimulé par des allergènes spécifiques, ainsi que par le tampon de stimulation et les contrôles de stimulation, pour évaluer la dégranulation des basophiles du patient *ex vivo*. L'échantillon est coloré à l'aide de deux anticorps monoclonaux marqués par fluorescence : un pour la sélection des basophiles (anti-CCR3-PE) et un pour la détermination du statut d'activation des basophiles (anti-CD63-FITC) (réf. 3-6). CD63 est une protéine transmembranaire présente sur les vésicules intracellulaires qui est uniquement présentée à la surface des cellules après la dégranulation des basophiles (réf. 7).

Les érythrocytes provenant de l'échantillon de patient sont éliminés par une réaction de lyse. En fonction du protocole, les cellules sont centrifugées, remises en suspension dans le tampon de lavage et fixées pour analyse ultérieure par cytométrie en flux ou analysées directement après la lyse. Les basophiles sont isolés de la population de leucocytes selon CCR3^{pos}/SSC^{bas}. Le statut d'activation des basophiles isolés est déterminé par leur expression de CD63 (marqueur d'activation). Les patients qui ne manifestent pas de réponses allergiques médies par IgE, appelés patients non répondants, sont identifiés à partir des résultats des contrôles positifs. La lecture des résultats du dosage est indiquée comme étant le rapport des basophiles CD63-positifs sur la totalité des basophiles (% d'activation de CD63).

RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

| Réactifs | Quantité | Code | Reconstitution |
|---|---------------------|-------------|---|
| Tampon de stimulation contenant du calcium, de l'héparine et IL-3 | 1 flacon lyophilisé | B-CCR-STB | Reconstituer avec 50 mL d'eau ¹⁾ |
| Contrôle de stimulation mAb anti-Fc ϵ RI | 1 flacon lyophilisé | B-CCR-STCON | Reconstituer avec 1,5 mL de B-CCR-STB |
| Contrôle de stimulation fMLP ²⁾ | 1 flacon lyophilisé | B-CCR-FMLP | Reconstituer avec 1,5 mL de B-CCR-STB |
| Réactif de coloration Mélange de mAb anti-CD63-FITC et anti-CCR3-PE | 1 flacon 2,2 mL | B-CCR-SR | Prêt à l'emploi |
| Réactif de lyse ³⁾ concentré 10x | 1 flacon 25 mL | B-CCR-LYR | Diluer avec 225 mL d'eau déionisée |
| Tampon de lavage avec 0,1 % de formaldéhyde | 1 flacon 100 mL | B-CCR-WB | Prêt à l'emploi |

Tableau 1

- 1) Pour les exigences sur la qualité de l'eau, consulter le chapitre « Précautions techniques »
- 2) N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
- 3) Des cristaux peuvent se former lors du stockage à 2-8 °C et doivent être remis en solution à 18-28 °C avant dilution

STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

| Réactifs non ouverts | |
|--|---|
| Stocker à 2-8 °C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption figurant sur les étiquettes. | |
| Réactifs ouverts et réactifs reconstitués | |
| Tampon de stimulation | Stable à -20 °C pendant 6 mois. |
| Contrôle de stimulation | Fractionner en aliquots en prévision d'un usage répété. |
| Contrôle de stimulation fMLP | |
| Réactif de lyse | |
| Réactif de coloration | Stable à 2-8 °C pendant 6 mois. |
| Tampon de lavage | |

Tableau 2

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Tubes de ponction veineuse traités K-EDTA
- Centrifugeuse
- Tubes pour cytométrie en flux jetables, apyrogènes, en polypropylène ou en polystyrène
- Portoirs de tubes pour cytométrie en flux pour la stimulation
- Vortex
- (Facultatif) Microplaques de culture de tissus pour stimulation cellulaire et coloration dans le protocole standard
- (Facultatif) Microplaques « Deep-well » pour stimulation cellulaire, coloration, lyse et acquisition en cytométrie en flux dans le protocole de lyse sans lavage
- Pipettes de précision à pointes jetables apyrogènes :
 - 10-100 µL, 100-1000 µL,
 - pipette ajustable de 1-5 mL et
 - distributeur ajustable de 10-50 µL
- Éprouvette de 50 mL pour reconstitution du tampon de stimulation
- Eau stérile, ultrapure et apyrogène pour reconstitution du tampon de stimulation (consulter le chapitre Précautions techniques)
- Bain-marie (recommandé) ou incubateur réglé à 37 °C
- Eau distillée ou déionisée ainsi que verrerie de laboratoire adaptée à la dilution du réactif de lyse
- Capuchons ou parafilm pour fermer les tubes pendant les étapes d'incubation
- Distributeurs sur flacon pour le réactif de lyse et le tampon de lavage
- Cytomètre en flux équipé d'une source laser à 488 nm (bleu) ainsi que de filtres d'émission pour la détection de PE et de FITC
- Logiciel d'analyse de cytométrie en flux (consulter le chapitre Acquisition des données de cytométrie en flux)

ALLERGENES A COMMANDER SEPARÉMENT

Les allergènes validés pour Flow CAST® sont proposés séparément par BÜHLMANN. Pour les codes de commande des allergènes, ainsi que des informations sur la préparation des allergènes, consulter les Livrets d'allergènes (Allergen Booklets) de BÜHLMANN sur le site Internet de BÜHLMANN :

www.buhmannlabs.ch

Important : Le test Flow CAST® a uniquement été testé en combinaison avec les allergènes CAST® Allergens disponibles auprès de BÜHLMANN Laboratories AG. La validation de l'utilisation des allergènes obtenus auprès d'autres sources relève de la seule responsabilité du laboratoire.

PRECAUTIONS

Précautions de sécurité

- Le tampon de stimulation (B-CCR-STB) de ce test contient des constituants d'origine humaine. Bien qu'ils aient été testés négatifs à l'antigène de surface du VHB, au VHC et aux anticorps du VIH1/2, les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux et conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire, ou BPL, en respectant les précautions appropriées.
- Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact accidentel, rincer immédiatement à grande eau.
- Traiter les réactifs et les produits chimiques comme des déchets dangereux conformément aux lignes directrices ou aux réglementations de sécurité nationales relatives aux substances présentant un risque biologique.

Précautions techniques

- Qualité d'eau recommandée pour le test Flow CAST® : L'emploi d'une eau stérile, ultrapure et apyrogène pour la reconstitution du tampon de stimulation (B-CCR-STB) est essentiel pour une stimulation correcte et reproductible des basophiles. Les eaux suivantes peuvent être employées : eau de qualité culture cellulaire, eau de qualité perfusion ou eau déionisée doublement distillée qui est filtrée sur ultrafiltre de 10 kDa régulièrement désinfecté.
- Le réactif de lyse (B-CCR-LYR) peut être reconstitué avec de l'eau déionisée doublement distillée, ou une eau de la même qualité que celle qui est employée pour la reconstitution du tampon de stimulation.
- Éviter toute contamination des allergènes pendant la stimulation cellulaire : les aéroallergènes du laboratoire peuvent contaminer les suspensions de cellules et les échantillons sanguins laissés ouverts, entraînant une amplification du bruit de fond. Les échantillons sanguins et les tubes de stimulation cellulaire doivent être fermés avec précaution à l'aide de capuchons ou de parafilm. La présence d'acariens domestiques, de plantes pollinisantes, de gants en latex ou d'équipements susceptibles de contenir du latex, doit être évitée au laboratoire où la stimulation cellulaire est effectuée. Ne pas ouvrir les fenêtres. Il est recommandé de mettre en œuvre les étapes de préparation des cellules et de stimulation sous une hotte à flux laminaire.
- Il est recommandé de chauffer au bain-marie plutôt qu'à l'incubateur pour optimiser le transfert de chaleur. En cas d'utilisation d'un incubateur, vérifier que la température est

de 37 °C. Toute température inférieure comme supérieure est susceptible d'affecter les résultats.

- Un niveau globalement faible d'activation des basophiles est attendu pour les allergènes médicamenteux. Il est donc crucial que des conditions optimales soient établies pendant la stimulation, y compris en terme de température. L'utilisation de tubes uniques au lieu de plaques Deep-Well est recommandée pour les allergènes médicamenteux.
- Les constituants ne doivent pas être employés après la date de péremption imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des lots de réactifs différents.
- Éviter toute contamination des réactifs.

Procédure de test

- Équilibrer le réactif de lyse à température ambiante (18-28 °C).
- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Les performances du test seront dégradées par une mauvaise manipulation ou dilution des réactifs, ou si ces derniers sont stockés dans des conditions ne respectant pas les instructions d'utilisation détaillées ici.
- Les échantillons qui ne sont pas manipulés correctement peuvent compromettre l'exactitude des résultats.
- Vérifier à l'œil nu les préparations pour évaluer l'efficacité de la lyse. Les érythrocytes peuvent être incomplètement lysés et apparaître sur un histogramme de diffraction de la lumière dans la même région que les leucocytes.
- Le prolongement de la lyse peut entraîner une perte de cellules. S'assurer de l'obtention de 300 basophiles minimum pour l'acquisition des données. Il est recommandé de réaliser dans l'heure l'acquisition des échantillons traités par le protocole de lyse sans lavage.
- La cytométrie en flux peut produire des résultats erronés si le cytomètre est mal aligné, si l'émission de fluorescence n'a pas été compensée de façon adéquate, ou si les régions de filtre n'ont pas été correctement positionnées.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Il est recommandé aux patients d'éviter les médicaments anti-allergiques administrés par voie systémique tels que les corticostéroïdes ou l'acide chromoglycique (DSCG) au moins 24 heures avant le prélèvement sanguin.

Prélever le sang dans des **tubes de ponction veineuse traités K-EDTA**, en remplissant les tubes jusqu'au trait de volume correspondant. Les tubes doivent être remplis au moins jusqu'à la moitié. Un (1) mL de sang total est suffisant pour environ 18 tubes à essai.

Ne pas centrifuger ou congeler des échantillons sanguins.

Sang total

Les échantillons de sang total conservés à 2-8 °C doivent être traités dans les 48 heures suivant le prélèvement.

Pour déterminer les troubles allergiques vis-à-vis de médicaments, il est conseillé de traiter les échantillons immédiatement et au maximum dans les 24 heures suivant leur prélèvement.

Les échantillons de sang total peuvent également être conservés à température ambiante (températures jusqu'à 28 °C). Ils doivent cependant être traités dans les 24 heures suivant le prélèvement selon le protocole

standard, ou le jour même du prélèvement selon le protocole de lyse sans lavage.

Échantillons traités

Les cellules traitées selon le protocole standard sont fixées. Les cellules fixées peuvent être stockées à 2-8 °C pendant 5 jours pour acquisition ultérieure par cytométrie en flux.

PROCEDURE DE DOSAGE

1. Mélanger l'échantillon sanguin traité par l'anticoagulant en retournant plusieurs fois le tube de ponction veineuse.
2. Préparer des tubes de cytométrie en flux standard frais et apyrogènes en polypropylène ou en polystyrène.
3. Pour chaque patient, marquer les tubes, p. ex. de la façon suivante :

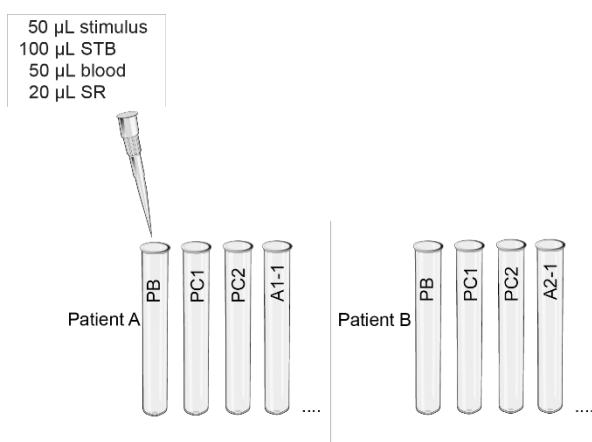
PB = bruit de fond du patient

PC1 = contrôle de stimulation Ac anti-FcεRI

PC2 = contrôle de stimulation fMLP

A1-1 pour l'allergène 1 avec la dilution 1

A1-2 pour l'allergène 1 avec la dilution 2 etc.



Stimulation et coloration

4. Ajouter 50 μL du stimulus correspondant à chaque tube :
Tube PB : 50 μL de **tampon de stimulation** (bruit de fond du patient)
Tube PC1 : 50 μL de **contrôle de stimulation** anti-FcεRI
Tube PC2 : 50 μL de **contrôle de stimulation** fMLP
Tube Ax-y : 50 μL d'**allergène**
5. Ajouter 100 μL de tampon de stimulation (STB) à chaque tube.
6. Ajouter 50 μL de sang total de patient à chaque tube. Vérifier que la paroi et le sommet du tube sont exempts de sang.
7. Mélanger délicatement.
8. Ajouter 20 μL de réactif de coloration (SR) à chaque tube.
9. Mélanger délicatement, couvrir les tubes et incuber pendant 15 minutes à 37 °C au **bain-marie**.

Remarque : Si un incubateur est utilisé au lieu d'un bain-marie, la durée d'incubation est prolongée jusqu'à 25 minutes du fait de l'efficacité moindre du transfert thermique.

Lyse

Remarque : Le réactif de lyse doit être équilibré à température ambiante (18-28 °C).

Protocole standard : Lyse et lavage

10. Ajouter 2 mL de réactif de lyse équilibré à température ambiante (18-28 °C) à chaque tube, mélanger délicatement.
11. Incuber pendant 5 à 10 minutes à 18-28 °C.
12. Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 500 x g.
13. Décanter le surnageant à l'aide de papier buvard.
14. Suspendre à nouveau le culot cellulaire dans 300 μL de tampon de lavage (le tampon de lavage contient un agent fixant).

Remarque : La quantité de tampon de lavage peut être adaptée à l'instrumentation de cytométrie en flux spécifique utilisée, en fonction du volume mort et de la densité cellulaire compatibles avec l'appareil.

15. Mélanger au vortex à basse vitesse.

Soit 16a. Procéder à l'acquisition des échantillons par le cytomètre en flux.

Soit 16b. Si l'acquisition n'est pas immédiatement réalisée, laisser les échantillons incuber pendant 30 minutes à TA et à l'abri de la lumière (fixation). Conserver les échantillons hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière à 2-8 °C jusqu'à la mesure. Les cellules fixées peuvent être stockées à 2-8 °C pendant 5 jours pour acquisition ultérieure par cytométrie en flux.

Remarque : Les échantillons fixés stockés peuvent être acquis sans aucun pré-traitement à tout moment. Consulter la section « Prélèvement et stockage des échantillons » pour prendre connaissance des durées de stockage. Une faible diminution de l'intensité de fluorescence et une récupération plus faible des basophiles $\geq 80\%$ peuvent être observées en cas de stockage prolongé.

Protocole alternatif : Protocole de lyse sans lavage

Les cytomètres en flux haute performance de nouvelle génération peuvent analyser les échantillons lysés non lavés. Cette procédure doit être adaptée à l'instrumentation de cytométrie en flux utilisée et peut nécessiter une optimisation. Le protocole ci-dessous se base sur les données acquises avec un cytomètre en flux Attune NxT (Thermo Fisher).

10. Exécuter les étapes 1 à 9 de la procédure de dosage (ci-dessus), puis passer à l'étape 10 ci-dessous. Ajouter 1,5 \pm 0,5 mL de réactif de lyse équilibré à température ambiante (18-28 °C) à chaque tube, puis mélanger délicatement (le volume doit être optimisé en fonction des capacités de vitesse d'acquisition du cytomètre en flux utilisé).
11. Procéder à l'acquisition des échantillons sur un appareil de cytométrie en flux à haut débit adapté, à une vitesse d'acquisition élevée, pour maintenir la durée d'analyse à un niveau minimal.

Remarque : Les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures suivant la réception de l'échantillon. Consulter la section « Prélèvement et stockage des échantillons ».

ACQUISITION DES DONNÉES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

L'acquisition des données par cytométrie en flux peut être réalisée sur n'importe quel type de cytomètre en flux équipé d'un laser argon opérant à 488 nm (lumière d'excitation bleu-verte).

Le cytomètre en flux doit être équipé pour détecter les canaux de diffusion vers l'avant (FSC), de diffusion latérale (SSC) et des deux fluorochromes FITC et PE.

Vérifier que le cytomètre en flux est correctement aligné, et que la compensation des couleurs est activée.

Pour l'acquisition et la caractérisation appropriées des basophiles au repos et activés, créer les histogrammes suivants :

1. Créer l'histogramme 1 de la prodiffusion (FSC) en fonction de la diffusion latérale (SSC) pour acquérir la totalité de la population de leucocytes comme indiqué sur la Figure 1. Pendant l'acquisition des échantillons, vérifier que la population des leucocytes est séparée en trois populations distinctes (lymphocytes, monocytes et granulocytes) sur l'histogramme de FSC/SSC. Ajuster l'amplification (gain) des signaux de FSC et de SSC pour obtenir une distribution comme indiqué sur la Figure 1. Consulter les manuels des cytomètres en flux pour plus d'instructions.
2. Créer l'histogramme 2 de CCR3-PE en fonction de la diffusion latérale (SSC) comme indiqué sur la Figure 2. Définir une fenêtre d'intérêt (p. ex. basophiles) incluant la totalité de la population de basophiles en tant que $CCR3^{pos}$ et SSC^{bas} comme indiqué par le filtre rectangulaire sur la Figure 2. Les éosinophiles, qui sont également $CCR3^{pos}$, doivent être exclus du fait de leur SSC élevée.
3. Créer l'histogramme 3 de CD63-FITC en fonction de CCR3-PE, qui ne présente que les basophiles sélectionnés, comme indiqué sur la Figure 3. À l'aide des basophiles au repos non stimulés du tube du bruit de fond du patient (PB), configurer une fenêtre incluant les cellules basophiles CD63-négatives dans le quart inférieur droit ($CD63^{neg} CCR3^{pos}/SSC^{bas}$) comme indiqué sur la Figure 3. Les basophiles activés par la stimulation des contrôles positifs et des allergènes spécifiques entraînent la formation d'une population de basophiles CD63-positifs ($CD63^{pos}/CCR3^{pos}/SSC^{bas}$) identifiés dans le quart supérieur droit, comme indiqué sur la Figure 4 avec un exemple de stimulation de contrôle positif (STCON).

La lecture des résultats du dosage est indiquée comme étant le rapport des basophiles CD63-positifs sur la totalité des basophiles (% d'activation de CD63), comme identifié dans la fenêtre de l'histogramme 3 pour l'un des tubes de stimulation.

Tous les événements - PB

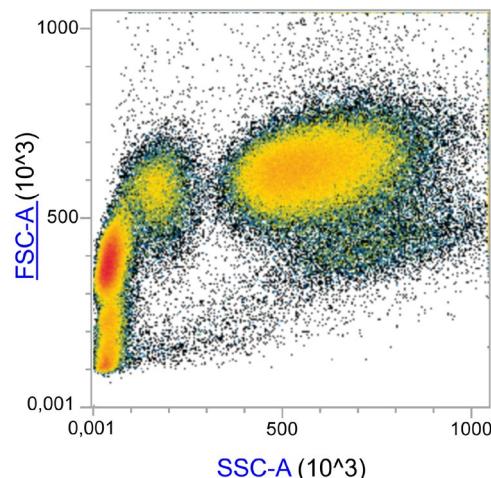


Figure 1 : Trois populations distinctes (lymphocytes, monocytes et granulocytes) sur un histogramme FSC/SSC.

Acquérir 500 cellules basophiles ou plus pour chacun des tubes de stimulation (sélectionnés comme indiqué dans l'histogramme 2, Figure 2 ci-dessous). Si l'acquisition comporte moins de 300 cellules basophiles (p. ex. en cas de basopénie), les résultats des tests ne peuvent pas être interprétés.

ANALYSE DES DONNEES

Les données acquises sont analysées à l'aide du logiciel d'analyse par cytométrie en flux approprié. Configurer les mêmes histogrammes et fenêtres que pour l'acquisition. Les fenêtres identifiant les basophiles dans l'histogramme 2 peuvent être adaptées de manière indépendante pour chacune des différentes stimulations pour un même échantillon de patient.

Pour l'évaluation correcte et la standardisation des résultats, un niveau de bruit de fond est défini pour chaque patient à l'aide du tube correspondant à la stimulation du bruit de fond (PB). La fenêtre configurée pour l'histogramme 3 doit être basée sur le PB. Pour standardiser l'analyse, la sélection est définie entre 2 et 2,5 % de basophiles activés (voir la Figure 3).

Ce fenêtrage doit être appliqué à toutes les stimulations ultérieures pour un même patient (PC1, PC2 et tous les allergènes mesurés) afin de calculer le pourcentage de cellules CD63-positives dans toutes les conditions de stimulation (voir la Figure 4).

Tous les événements - PB

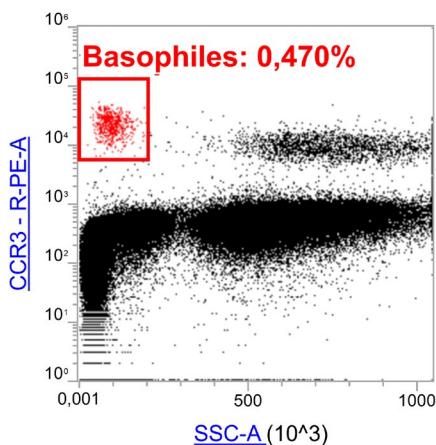


Figure 2 : Sélection des cellules basophiles CCR3^{pos}/SSC^{bas}

Basophiles - PB

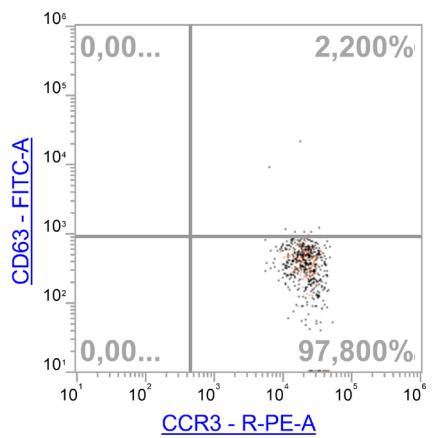
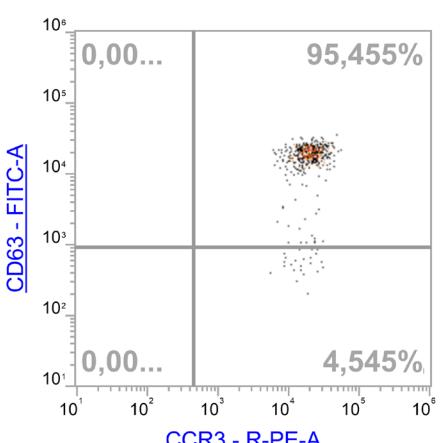


Figure 3 : Bruit de fond du patient (PB) avec STB uniquement

Basophiles - PC



| Fenêtre | Numération (n =) | % |
|---------------|------------------|-------|
| Total | 130 926 | 100,0 |
| Basophile | 506 | 0,386 |
| Q2 (CD63 pos) | 483 | 95,5 |
| Q4 (CD63 neg) | 23 | 4,5 |

Figure 4 : Contrôle de stimulation (STCON)

CONTROLE DE QUALITE

Les critères et mesures de contrôle de qualité suivants doivent être respectés pour obtenir un résultat valide :

Populations de leucocytes : en règle générale, trois populations de leucocytes distinctes, les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes, doivent apparaître sur le graphique de FSC/SSC (voir la Figure 1). Leur présence peut être considérée comme un critère de qualité de l'échantillon sanguin (délai entre le prélèvement de l'échantillon et l'exécution du dosage, conditions de stockage). Les résultats des tests ne peuvent pas être évalués si moins de 300 basophiles ont été acquis.

Contrôles de stimulation (positifs) mAb anti-FcεRI et fMLP : l'anticorps monoclonal (mAb) anti-FcεRI mime la liaison au récepteur provoquée par l'allergène, *in vivo*. fMLP est un tripeptide provoquant une activation non immunologique des basophiles.

- Si le contrôle mAb anti-FcεRI présente une valeur $\geq 10\%$ de basophiles activés, les échantillons peuvent être évalués.
- Si seul le contrôle fMLP présente un signal $\geq 10\%$, mais pas le mAb anti-FcεRI, le dosage a été exécuté correctement mais les résultats des tests ne peuvent pas être évalués. Le patient est considéré comme non-répondeurs IgE.
- Si le mAb anti-FcεRI et fMLP présentent tous deux des valeurs de basophiles activés $< 10\%$, il est probable qu'une erreur technique se soit produite. Le résultat du test doit être considéré comme non valide et le test doit être répété.

NORMALISATION

Le dosage Flow CAST® détecte la population de basophiles exprimant le marqueur de surface cellulaire CD63 sous forme de pourcentage des basophiles totaux. Il n'existe pas de substances de référence ou de procédures de mesure de référence reconnues au niveau national ou international pour cet analyte.

La reproductibilité entre lots est garantie par le titrage des conjugués d'anticorps monoclonaux anti-CD63-FITC et anti-CCR3-PE par rapport à des billes d'étalonnage. Pour une estimation de la variation entre lots, consulter les résultats de reproductibilité dans la section « Caractéristiques de performance ».

LIMITES

- Les résultats du test Flow CAST® doivent être interprétés en conjonction avec d'autres résultats cliniques et analyses de laboratoire.
- Pour déterminer les troubles allergiques liés au médicament, un test TAB doit être exécuté dans les 6 mois qui suivent la réaction allergique (réf. 8).
- Au minimum une à deux semaines doivent s'être écoulées après une réaction allergique, pour exécuter le test TAB (réf. 8).
- Les résultats négatifs obtenus pour les allergènes médicamenteux ne doivent pas être utilisés pour exclure des allergies.
- 5 à 10 % des patients sont attendus comme étant non IgE-répondeurs. Pour ces patients, une augmentation de l'expression de CD63 et un résultat positif ne seront pas observés. Les non-répondeurs peuvent être identifiés à

l'aide des contrôles de stimulation fournis avec le test Flow CAST® (réf. 9).

- Des tubes traités K-EDTA insuffisamment remplis (à moins de la moitié) peuvent mener à des résultats faux négatifs.
- Une interférence avec les résultats du test Flow CAST® est attendue chez les patients sous traitement par omalizumab (XOLAIR®) (réf. 10).
- Il est recommandé d'éviter la prise de médicaments antiallergiques systémiques comme les corticoïdes ou l'acide chromoglycique (DSCG) au moins 24 heures avant le prélèvement de l'échantillon sanguin.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les catégories de résultats du dosage Flow CAST® sont les suivantes :

| Résultat | Interprétation |
|--|----------------|
| < seuil | négatif |
| ≥ au seuil pour une ou pour les deux dilutions de l'allergène. | positif |

Tableau 3

SEUIL ET INTERVALLE DE REFERENCE

Un seuil technique de 5 % de basophiles activés a été établi, les résultats ≥ 5 % de CD63^{pos} indiquant une activation des basophiles.

Pour chaque allergène, la spécificité est améliorée en utilisant les seuils spécifiques de chaque allergène, comme indiqué dans les Livrets d'allergènes (Allergen Booklets) de BÜHLMANN.

Les intervalles de référence ont été établis selon la ligne directrice C28-A3 du CLSI. Cent vingt (120) échantillons sanguins issus d'un centre de don du sang ont été stimulés par un tampon de stimulation ou un mAb anti-FcεRI avant d'être testés conformément aux protocoles standard et de lyse sans lavage. Les tests ont été effectués sur une durée de 26 jours par trois opérateurs avec deux lots de réactifs Flow CAST®.

| Contrôle | Protocole de dosage | Intervalle de référence (IC à 90 %) [% CD63 ^{pos}] | |
|-----------------------|---------------------|--|-----------------------------|
| | | 2,5 ^{ème} centile | 97,5 ^{ème} centile |
| Tampon de stimulation | Standard | 0,8 (0,5 - 1,2) | 4,6 (4,1 - 6,4) |
| | Lyse sans lavage | 0,9 (0,6 - 1,0) | 4,2 (3,9 - 5,3) |
| mAb anti-FcεRI | Standard | 18,0 (11,5 - 26,0) | 97,7 (96,0 - 98,5) |
| | Lyse sans lavage | 13,2 (11,4 - 21,2) | 96,4 (94,3 - 97,3) |

Tableau 4

PERFORMANCES CLINIQUES

Les performances cliniques du dosage Flow CAST® ont été évaluées dans une revue systématique bibliographique de la littérature scientifique. Onze études évaluées par des pairs, identifiées dans une recherche bibliographique systématique couvrant une période allant jusqu'à novembre 2019, une étude sur les venins d'insectes non identifiée dans la recherche d'origine et deux études sur les allergènes

d'arachide publiées après 2019 ont été incluses dans l'analyse. Les études s'intéressaient à la capacité du dosage Flow CAST® à différencier les sujets atteints de troubles allergiques tel que confirmé par a) les antécédents cliniques du patient b) la provocation aux aliments par voie orale (Oral Food Challenge, OFC) ou un test de provocation c) les antécédents cliniques et des analyses de laboratoire (essai cutané de type prick - SPT, sIgE) ou d) les antécédents cliniques et OTC/test de provocation et sujets non allergiques. Les études utilisant sIgE ou SPT en tant que seule référence clinique ont été exclues. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

| Groupe d'allergènes | N étude | Sensibilité médiane (plage) | Sujets allergiques (total) | Spécificité médiane (plage) | Sujets contrôles (total) |
|------------------------------|---------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Aliments Substances inhalées | 5 | 92 % (81-100 %) | 311 | 93 % (80-100 %) | 240 |
| Venins d'insectes | 2 | 87 % (73-89 %) | 79 | 96 % (95-97 %) | 39 |
| Médicaments | 7 | 55 % (0-68 %) | 227 | 91 % (79-100 %) | 167 |

Tableau 5

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Précision intra-laboratoire : ≤ 25 % CV pour le stimulus

La répétabilité (intra-analyse) et la précision intra-laboratoire ont été établies selon la ligne directrice EP05-A3 du CLSI et de la norme ISO 15197:2013. Quatre échantillons sanguins de donneurs ont été stimulés avec le tampon de stimulation ou le contrôle de stimulation mAb anti-FcεRI. Pour la procédure standard, un modèle d'étude 2 opérateurs x 4 jours x 1 analyse x 4 réplicats a été utilisé. Pour la procédure de lyse sans lavage, un modèle d'étude 2 opérateurs x 1 jour x 4 analyses x 4 réplicats a été utilisé. Un correspond à une réaction de stimulation indépendante et à une procédure de dosage complète. Les résultats du contrôle de stimulation mAb anti-FcεRI sont résumés dans le tableau 6.

| Option de dosage | Donneur | Moyenne [% CD63] | n | Intra-analyse [% CV] | Jour-à-jour (A) Entre analyses [% CV] | Total [% CV] |
|------------------|---------|------------------|----|----------------------|---------------------------------------|--------------|
| Standard | 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 sans lavage | 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 % |

Tableau 6

Reproductibilité : ≤ 25 % CV pour le stimulus

La reproductibilité a été établie selon la ligne directrice EP05-A3 du CLSI et la norme ISO 15197:2013. Quatre échantillons sanguins de donneurs ont été stimulés avec le tampon de stimulation ou le contrôle de stimulation mAb anti-FcεRI. Les échantillons ont été analysés sur deux sites de laboratoire conformément au protocole standard. Un modèle d'étude 3 instruments/lots x 2 opérateurs x 1 jour x 5 réplicats a été utilisé. Une réplicat correspond à une réaction de stimulation indépendante et à une procédure de

dosage complète. Les résultats du contrôle de stimulation mAb anti-Fc ϵ RI sont résumés dans le tableau 7.

| Donneur | Moyenne [% CD63] | n | Intra-analyse [% CV] | Entre opérateurs [% CV] | Entre lots/instruments [% 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 % |

Tableau 7

SUBSTANCES INTERFERENTES

La sensibilité du dosage Flow CAST® aux substances pharmaceutiques, aux états anormaux du sang et à l'additif K-EDTA a été évaluée conformément à la ligne directrice EP07-A2 du CLSI. Un biais dans les résultats dépassant 20 % pour le contrôle de stimulation mAb anti-Fc ϵ RI et 20 % de CD63^{pos} (en valeur absolue) pour le contrôle de stimulation fMLP a été considéré comme une interférence.

Aucune interférence n'a été détectée, aux concentrations indiquées, avec les substances répertoriées dans le tableau 8. Une interférence a été détectée avec K-EDTA à une concentration double du tube de ponction veineuse K-EDTA pour un donneur.

| Principe actif | Concentration de test [µg/mL] |
|----------------------------|-------------------------------|
| Fexofénadine chlorhydrate | 1,6 |
| Cétirizine dichlorhydrate | 4,35 |
| Hydroxyzine dichlorhydrate | 0,27 |
| Kétotifène | 0,6 |
| Montélukast | 3,84 |
| Prednison | 1,2 |
| N-Acetyl-L-tryptophane | 30 |
| Triglycéride (Intralipide) | 20 000 |
| Bilirubine conjuguée | 400 |
| Bilirubine non conjuguée | 400 |
| Hémolyse | 56 100 |

Tableau 8

REFERENCES

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).

RAPPORTS D'INCIDENTS DANS LES ÉTATS MEMBRES DE L'UE

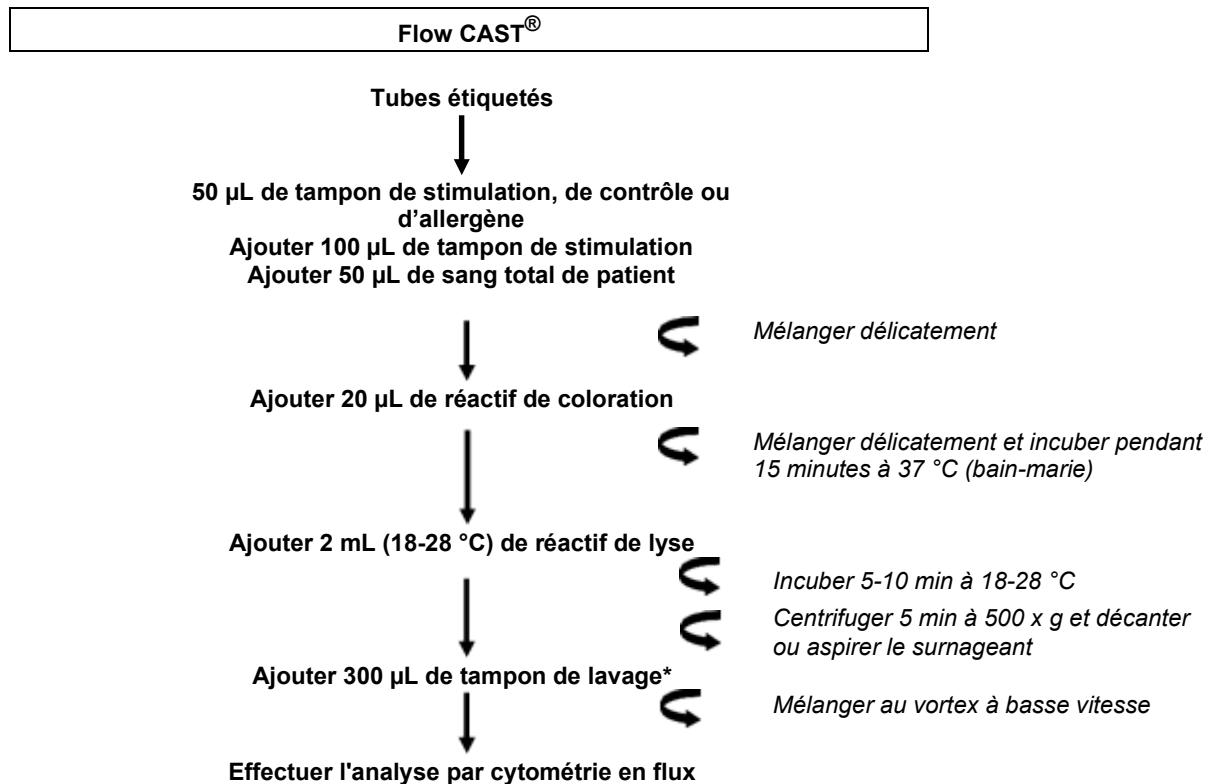
En cas d'incident grave en lien avec ce dispositif, signalez-le sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de votre État Membre.

DOMMAGES PENDANT L'EXPÉDITION

Notifier le distributeur si ce produit a été reçu endommagé. Veuillez notifier votre distributeur si vous avez reçu un produit endommagé.

MODES OPÉATOIRES SIMPLIFIÉS

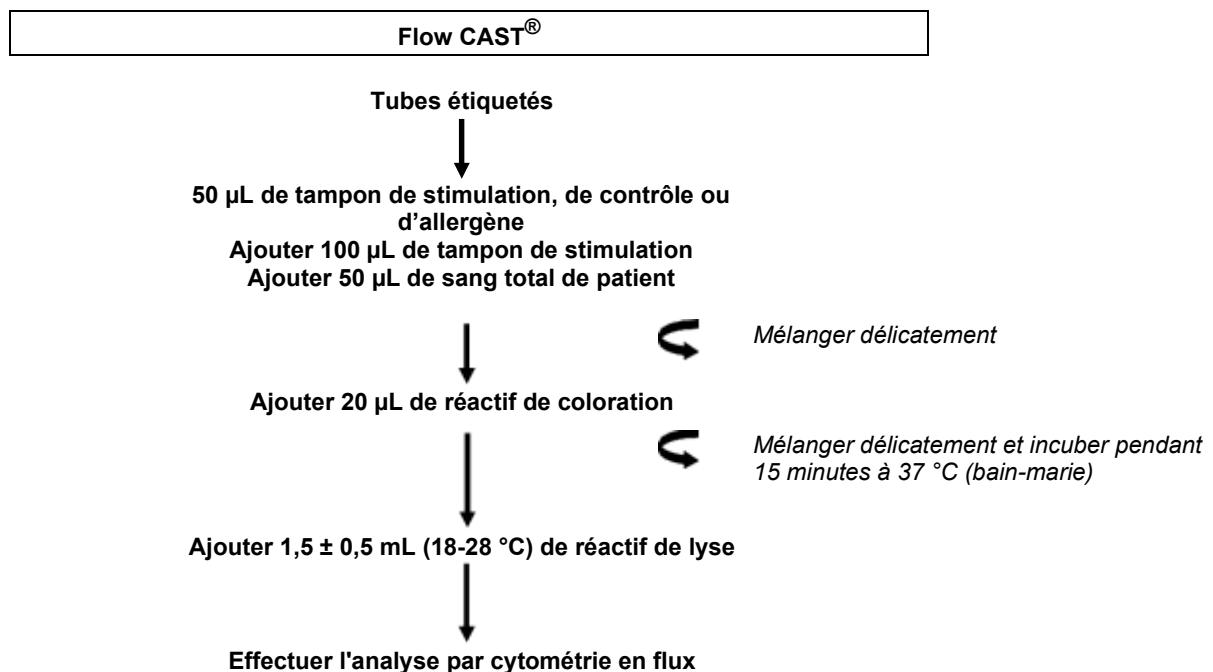
OPTION A : PROCÉDURE STANDARD



DURÉE AVANT ACQUISITION ~30 MIN / DURÉE AVANT RÉSULTAT : ~ 1 HEURE

* Remarque : Selon l'instrumentation de cytométrie en flux utilisée, adapter la quantité de tampon de lavage en fonction du volume mort et de la densité cellulaire compatibles avec l'instrument.

OPTION B : PROCÉDURE DE LYSE SANS LAVAGE



DURÉE AVANT ACQUISITION ~20 MIN / DURÉE AVANT RÉSULTAT : ~ 1 HEURE

SYMBOLES

BÜHLMANN utilise les signes et symboles répertoriés et décrits dans la norme ISO 15223-1. De plus, les signes et symboles suivants sont utilisés :

| Symbol | Définition |
|----------------|------------------------------|
| BUF STIM | Tampon de stimulation |
| CONTROL STIM | Contrôle de stimulation |
| CONTROL FMLP | Contrôle de stimulation fMLP |
| REAG STAIN | Réactif de coloration |
| REAG LYS | Réactif de lyse |
| BUF WASH | Tampon de lavage |



BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Suisse
Tél.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

