



Flow CAST®

Procedura

FK-CCR

A Commitment to Diagnostics

Pre analitica

Tipo di Campione	sangue intero EDTA
Conservazione dei campioni	fino a 48h a 2-8°C (fino a 24h per determinazione di allergia a farmaci) non congelare
Raccolta dei campioni	il sangue deve essere raccolto prima di test cutanei o provocazioni in vivo le provette di raccolta EDTA devono essere riempite oltre il 50%
Pazienti	i pazienti devono interrompere trattamenti con farmaci come antistaminici, corticosteroidi o acidi cromoglicici almeno 24 ore prima del prelievo

Attrezzature necessarie

- Bagno termostato (37°C) o incubatore
- Citofluorimetro con diodo laser argon 488 nm
Il citometro a flusso deve essere in grado di determinare i quattro parametri:
 1. la rifrazione lineare (Forward Scatter, FSC),
 2. la rifrazione laterale (Side Scatter, SSC) e
 - 3.-4. di rilevare i due fluorocromi FITC e PE.

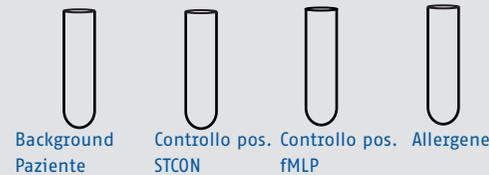
Allergeni BÜHLMANN

- Risospingere gli allergeni con 250 µl di Stimulation Buffer
- Si possono eseguire fino a 4 stimolazioni con una fiala di allergene
- Gli allergeni sigillati si possono conservare a 2-8°C fino a data di scadenza
- Gli allergeni Ape e Vespa (BAG2-I1/I3), una volta ricostituiti, sono stabili conservati per 1 mese a -20°C

Stimolazione/Marcatura e Lisi

Preparare i singoli tubi:

- Background paziente
- Controlli positivi (Ab anti-FcεRI ; fMLP)
- Allergeni



Aggiungere 50 µl di Stimulation Buffer (Background paziente) o controllo positivo (Ab anti-FcεRI) o controllo positivo (fMLP) o allergene

Aggiungere 100 µl di Stimulation Buffer

Aggiungere 50 µl di sangue intero del paziente (EDTA)
Agitare delicatamente

Aggiungere 20 µl di Staining Reagent

Agitare delicatamente e incubare per 15 minuti*1 a 37°C o 25 minuti*2 (bagnomaria*1 / incubatore*2)

Aggiungere 2.0 ml di Lysing Reagent preriscaldato (18-28°C)

Incubare per 5-10 minuti a 18-28°C
Centrifugare 5 minuti a 500 x g e decantare o aspirare il surnatante

Aggiungere 300 µl di Wash Buffer *

Vortex delicatamente

Acquisire i dati al Citofluorimetro

*A seconda del citofluorimetro potrebbe essere necessario un volume maggiore di wash buffer (800 µl)

Tempo totale del dosaggio: ~60 minuti

Acquisizione dati

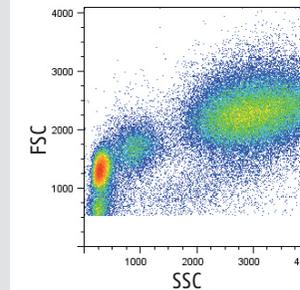


Figura 1: Tre popolazioni; linfociti, monociti e granulociti nell' istogramma FSC/SSC.

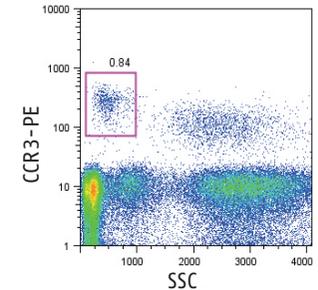
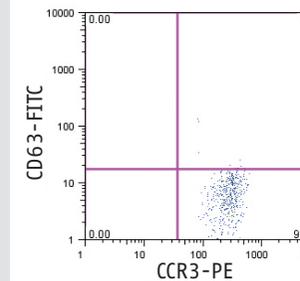
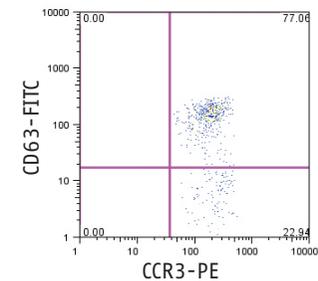


Figura 2: Selezione dei basofili CCR3^{pos} / SSC^{low}



Gated Region	Count (n=)	%
Totale	602	100.0
Q2 (CD63 ^{pos})	11	1.7

Figura 3: Background paziente (PB) solo Stimulation Buffer.



Gated Region	Count (n=)	%
Total	650	100.0
Q2 (CD63 ^{pos})	467	77.1

Figura 4: controllo positivo (PC) con Ab anti-FcεRI.





Flow CAST®

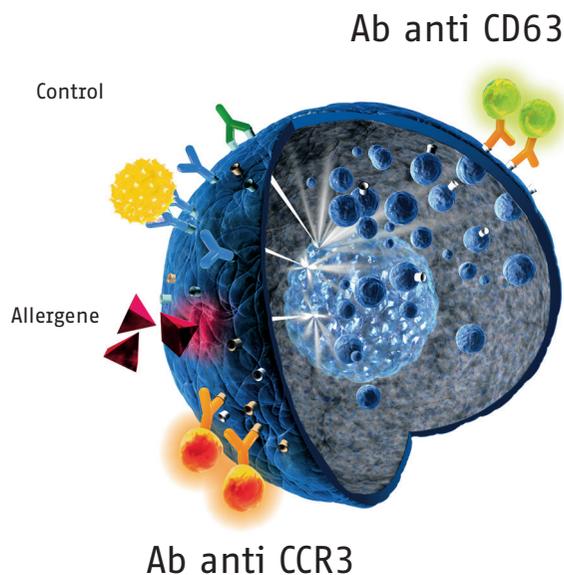
Caratteristiche

FK-CCR

Principio del dosaggio

Il Flow CAST® è un test per la valutazione dell'attivazione dei basofili (BAT) che può essere utilizzato per la determinazione *in vitro* di reazioni allergiche immediate e ipersensibilità verso allergeni sospetti.

Il test è indicato per la determinazione diagnostica *in vitro* del marcatore di attivazione di superficie del basofilo CD63 su sangue intero con un metodo di citometria a flusso tramite stimolazione allergenica.



Numero di pazienti dosabili per kit:

1 allergene/ 1 conc.	25 pazienti
2 allergeni/ 1 conc.	20 pazienti
3 allergeni/ 2 conc.	16 pazienti

Caratteristiche del Test

Specificità

Il CCR3 è costitutivamente espresso sulla superficie degli eosinofili e dei basofili ed in piccola parte sulle cellule CD3+ (linfociti). Campioni provenienti da 8 donatori sani sono stati sottoposti a doppia colorazione con anti-CCR3-PE e anti-CD3-AF647. Il numero relativo (media) di cellule CD63+ nella popolazione di basofili all'interno del gating era del 3.9% (95%CI: 2.5-5.2%).

Recupero dei Basofili > 500 basofili/tubo

102 campioni provenienti da donatori sani e pazienti allergici mostravano una mediana di 526 cellule (95% CI: 481-578 basofili)

Precisione (Background paziente) 16.2 %CV

Un campione incubato 20 volte e di seguito analizzato.
Media: 2.4%; SD: 0.4%

Precisione (Controllo Positivo) 5.4 % CV

Un campione incubato 20 volte e di seguito analizzato.
Media: 35,5%; SD: 1.9%

Variazione Inter Operatori 3.7-8.1% CV

Due campioni dosati da cinque diversi tecnici nello stesso giorno.

anti-FcεRI Ab **media: 69.6%; SD: 2.6%**
fMLP **media: 48.1%; SD: 3.9%**

Cut off

Inalanti	≥15 % CD 63+	
Alimenti	≥15 % CD 63+	
Imenotteri	≥10 %CD 63+	
Beta lattamici	≥5 %CD 63+	SI ≥ 2
Analgesici	≥5 %CD 63+	SI ≥ 2
Additivi Alimentari	≥5 %CD 63+	SI ≥ 2

SI = Indice di Stimolazione: %CD63+allergene diviso per %CD63+Background paziente.

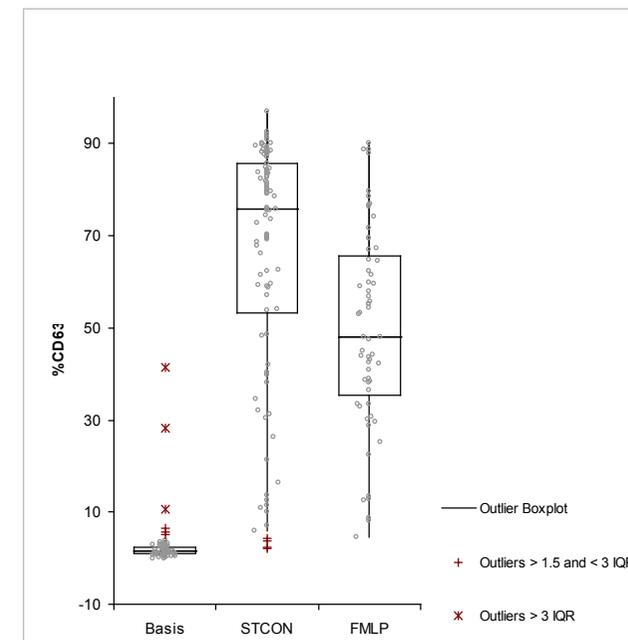


Figura 5: Box Plot di Controlli positivi e negativo in donatori sani. Basis: Background paziente (n=98); STCON: controllo positivo anti-FcεRI mAb (n=98); FMLP: controllo positivo fMLP.

Codice prodotto:
FK-CCR 100 tests

CE-marked product

CAST® is a registered trademark of BÜHLMANN in many countries.



BÜHLMANN Laboratories AG
Switzerland
info@buhlmannlabs.ch
www.buhlmannlabs.ch
Phone +41 61 487 12 12

BUHLMANN Italia Srl
Italy
info@buhlmannlabs.it
www.buhlmannlabs.it
Fax ordini +41 61 48712 99