



Flow2 CAST[®]

Procédure

FK-CCR

Pré-Analytique

- Echantillons requis** Sang total EDTA.
1 ml de sang suffit pour environ 18 tubes.
- Stockage des échantillons** 2-8°C jusqu'à 48 heures.
(allergies médicamenteuses 24 heures seulement)
Ne pas congeler ou centrifuger.
- Recueil des échantillons** Le sang doit être prélevé avant les tests cutanés ou les tests de provocation in vivo.
Le tube de prélèvement EDTA doit être rempli >50%.
- Patient** Les traitements médicamenteux comme les anti histaminiques, corticostéroïdes ou acide chromoglycique doivent être stoppés 24 heures avant le prélèvement.

Matériel nécessaire

- Bain marie (37°C)
- Cytomètre de flux avec une diode laser à l'argon opérant à 488 nm (lumière d'excitation bleu-verte)

Points importants

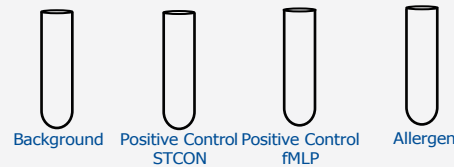
Allergènes BÜHLMANN

- Reconstituer les allergènes avec 250 µl de tampon de stimulation.
- Chaque flacon permet de réaliser 4 stimulations.
- Utiliser des allergènes fraîchement reconstitués à chaque stimulation.
- Flacons non ouverts: conservation à 2 - 8°C jusqu'à la date d'expiration.
- Les allergènes reconstitués d'abeille et de guêpe (BAG2-I1/-I3) sont stables un mois à -20°C.

Stimulation/Coloration et Lyse

Identifier les tubes

- Background
- Contrôles de stimul.(Ac anti-FcεRI ; fMLP)
- Allergènes



Ajouter 50 µl de tampon de stimulation (Background) ou de contrôle de stimulation (Ac anti-FcεRI) ou de contrôle de stimulation (fMLP) ou d'allergène (s)

Ajouter 100 µl de tampon de stimulation

Ajouter 50 µl de sang total EDTA du patient

Mélanger légèrement

Ajouter 20 µl de réactif de coloration

Mélanger légèrement et incuber 15 minutes à 37°C (bain marie)

Ajouter 2.0 ml de réactif de lyse préchauffé (18-28°C)

Incuber 5-10 minutes à 18-28°C

Centrifuger 5 minutes à 500 x g et aspirer le surnageant.

Ajouter 300 µl de tampon de lavage*

Vortexer légèrement

Procéder à l'acquisition des données au cytomètre de flux

* En fonction du cytomètre de flux utilisé, une quantité plus importante de tampon de lavage (par ex. 800 µl) pourrait s'avérer nécessaire.

Résultats: ~60 minutes

Acquisition des données

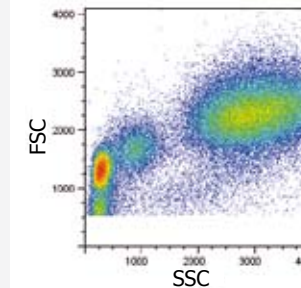


Figure 1: Trois populations; lymphocytes, monocytes et granulocytes dans un histogramme FSC/SSC.

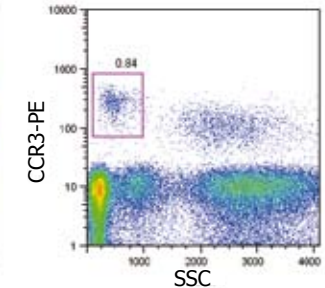
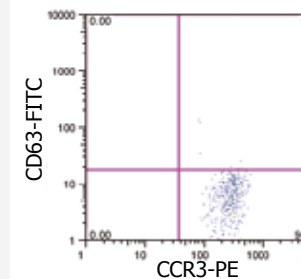
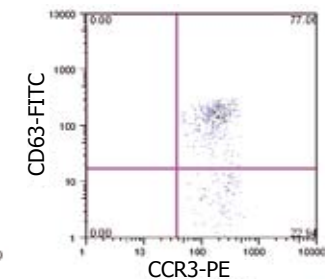


Figure 2: Sélection des basophiles CCR3^{pos} / SSC^{low}



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

Figure 3: Background d'un patient (PB) avec du tampon de stimulation seulement.



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

Figure 4: Contrôle de stimulation positif (PC) avec le contrôle de stimulation Ac anti-FcεRI.



Flow2 CAST®

Caractéristiques

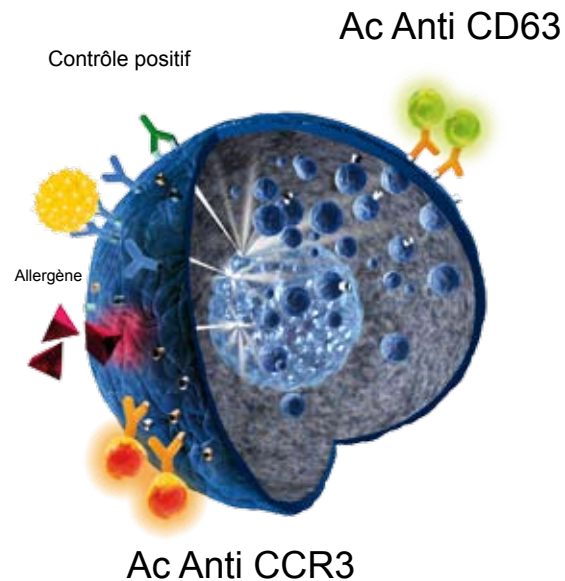
FK-CCR

A Commitment to Diagnostics

Domaine d'utilisation

Le kit Flow2 CAST® est un test d'activation des basophiles (TAB) qui peut être utilisé pour l'exploration in vitro des réactions de type allergique immédiates et les hypersensibilités.

Il est destiné à la détermination diagnostique in vitro par cytométrie de flux de l'expression du marqueur de surface CD63 sur des basophiles dans le sang total après stimulation antigénique.



Nombre de tests réalisables par kit

1 Allergène/ 1 conc.	25 patients
2 Allergènes/ 1 conc.	20 patients
3 Allergènes/ 2 conc.	10 patients

Caractéristiques du test

Spécificité

Le CCR3 est constitutivement exprimé sur les leucocytes éosinophiles et les basophiles et, dans une moindre proportion sur les cellules CD3+ (lymphocytes). Les échantillons de 8 donneurs de sang normaux ont subi une double coloration à deux reprises avec les anti-CCR3-PE et les anti-CD3-AF647. La quantité relative (moyenne) de cellules CD3+ au sein de la population de Basophiles était de 3.9% (95%CI: 2.5-5.2%)

Recouvrement des basophiles >500 basophiles/tube
102 échantillons provenant de donneurs normaux et de patients allergiques donne un taux moyen de 526 cellules (95% CI: 481-578 basophiles)

Précision (Background du patient) 16.2 %CV

Le même échantillon de sang est incubé 20 X avec le tampon de stimulation et analysé ensuite. Mean: 2.4%; SD: 0.4%

Précision (Contrôle de stimulation positif) 5.4 %CV

Le même échantillon de sang est incubé 20 X avec le contrôle positif (STCON) et analysé ensuite. Mean: 35.5%; SD: 1.9%

Variation inter techniciens 3.7-8.1%CV

Deux échantillons ont été testés par 5 techniciens différents le même jour

anticorps anti-FcεRI	mean: 69.6%; SD: 2.6%
fMLP	mean: 48.1%; SD: 3.9%

Valeurs seuil

Aéroallergènes	≥15 % CD 63+	
Allergènes alimentaires	≥15 % CD 63+	
Venins d'hyménoptères	≥10 % CD 63+	
Bêta-lactamines	≥5 % CD 63+	SI ≥2
Analgésiques	≥5 % CD 63+	SI ≥2
Additifs alimentaires	≥5 % CD 63+	SI ≥2

SI = Index de stimulation : % CD63+ Allergène divisé par le % CD63+ du Background du patient.

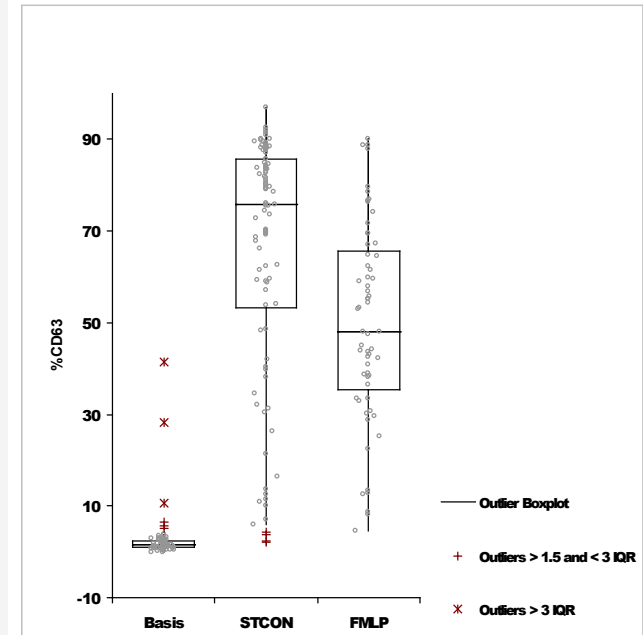


Figure 5: Box Plot contrôles positifs et négatifs de donneurs de sang normaux. Basis: contrôle négatif (n=98); STCON: contrôle positif anti-FcεRI mAb (n=98); MLP: contrôle positif fMLP (n=61)

Code commande:
FK-CCR 100 tests



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

BÜHLMANN France SAS
France
info@buhlmannlabs.fr
www.buhlmannlabs.fr
Phone +33 89 66 91 14