



Flow CAST®

Durchführung

FK-CCR

Präanalytik

Probenmaterial	EDTA Vollblut;
Probenlagerung	bei 2-8° C bis zu 48 Stunden, bei Medikamentenallergien bis zu 24 Stunden; nicht einfrieren!
Probengewinnung	Abnahme vor dem Haut- oder Provokationstest. Die EDTA Tubes müssen zu mindestens 50% mit Blut gefüllt werden.
Medikamenteninterferenz	Eine Behandlung mit Medikamenten wie z.B. Antihistaminika, Corticosteroiden oder Chromoglycinsäure sollte möglichst 3-7 Tage vor der Probennahme abgesetzt werden

Spezielle Ausrüstung

- Wasserbad, Inkubator (37°C)
- Durchflusszytometer mit Laserdiode bei 488 nm und den folgenden 4 Parametern:

1. Forward Scatter, 2.Side Scatter
- 3.-4. Zwei Kanäle für die Fluorochrome FITC und PE (FL1, FL2)

BÜHLMANN Allergene

- Allergene mit 250 µl Stimulationspuffer lösen
- Bis zu 4 Stimulationen aus einem Allergen fläschchen
- Zur Stimulation frisch aufgelöste Allergene verwenden
- Aufgelöste Bienen/Wespen Gift Allergene (BAG2-I1 &BAG2-I3) sind für 1 Monat stabil bei - 20° C

Assaydurchführung

- Röhrchen vorbereiten für - Background
- Positivkontrollen (anti-FcεRI Ak; fMLP)
- Allergene

Pro Röhrchen werden pipettiert:

50 µl Stimulationspuffer (Background) oder Positivkontrolle (anti-FcεRI Ab) oder Positivkontrolle (fMLP) oder je Allergen

100 µl Stimulationspuffer

50 µl Vollblut pro Patient (EDTA)

vorsichtig mischen

20 µl Färbereagenz

vorsichtig mischen und bei 37° C für 15 Min. im Wasserbad oder 25 Min. im Inkubator inkubieren

2.0 ml temperiertes (18-28°C) Lyse-Reagenz

5-10 Minuten bei 18-28°C inkubieren

5 Minuten bei 500Xg zentrifugieren und den Überstand absaugen oder dekantieren.

300 µl Waschpuffer*

vorsichtig vortexten

Datenauswertung mit dem Flowzytometer

*abhängig vom Flowzytometer kann eine grössere Menge Waschpuffer (z.B. 800 µl) erforderlich sein.

Time to results: ~60 Minuten

Datenauswertung

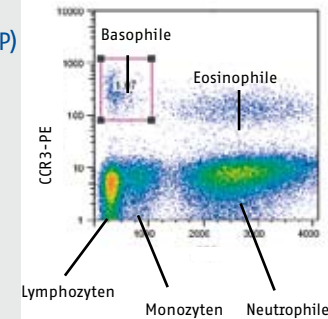


Abb. 1: Selektion der basophilen Zellen mittels CCR3^{pos} / Sideward Scatter^{low}

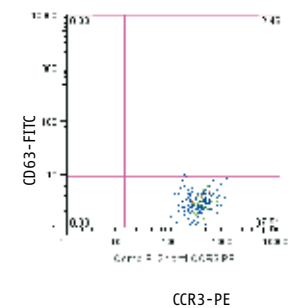


Abb. 2: Patient Background (PB) mittels Stimulationspuffer

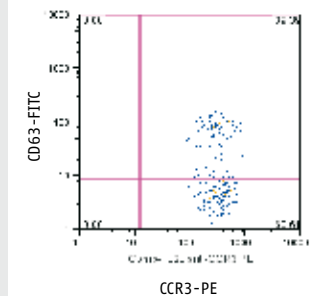


Abb. 3: Positivkontrolle (PC) Stimulation über den FcεRI Rezeptor

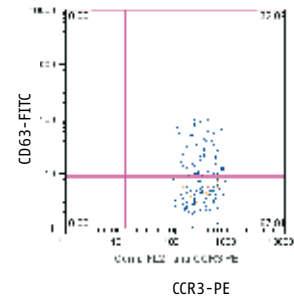


Abb. 4: Positivkontrolle (PC) Stimulation über den fMLP Rezeptor

IgE-vermittelter Mechanismus über den FcεRI Rezeptor

Nicht IgE-vermittelter Mechanismus über den fMLP Rezeptor

Zwei Positivkontrollen erhöhen die Effizienz der Bestimmung (5-10% Nonresponder)



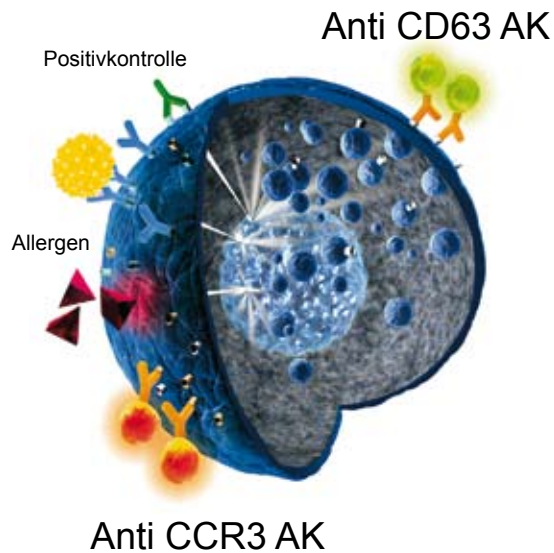
Flow CAST®

Charakteristika

FK-CCR

Assayprinzip

Flow CAST® ist ein Basophilenaktivierungstest, mit dem allergische Reaktionen und Hypersensitivitäten vom Soforttyp nachgewiesen werden können. Es erfolgt eine Zellstimulation nach Kontakt mit spezifischen Allergenen und eine anschließende quantitative *in-vitro* Bestimmung der Expression von CD63 auf der Oberfläche von Basophilen.



Anzahl von Analysen / Kit

1 Allergen/1 Konz.	25 Patienten
2 Allergene/1 Konz.	20 Patienten
3 Allergene/1 Konz.	16 Patienten

Assay Qualität

Spezifität

CCR3 ist konstitutiv auf der Oberfläche von eosinophilen und basophilen Leukozyten und zu einem geringeren Teil auch auf CD3⁺ Lymphozyten exprimiert. Proben von 8 negativen Blutspendern wurden mit Anti-CCR3-PE und Anti-CD3-AF647 gefärbt. Die relative Häufigkeit (Mittelwert) von CD3⁺ Zellen in der untersuchten Basophilenpopulation war 3.9 % (95 % CI: 2.5-5; 2 %).

Wiederfindung Basophile >500 Basophile/Röhrchen

102 Proben von negativen Blutspendern und allergischen Patienten wiesen einen Median von 526 Zellen auf (95 % CI: 481-578 Basophile).

Präzision (Patienten Background) 16.2 % CV

n=1; 20fach Mittelwert: 2.4%; SD: 0.4 %

Präzision (Positivkontrolle) 5.4 % CV

n=1; 20fach; Mittelwert: 35.5%; SD: 1.9 %

Variation zwischen Anwendern 3.7-8.1 % CV

2 Proben wurden von 5 Laboranten an einem Tag gemessen.

anti-FcεRI AK Mittelwert: 69.6%; SD: 2.6%

fMLP Mittelwert: 48.1%; SD: 3.9%

Cut-off

Inhalationsallergene	≥15 % CD 63 ⁺	
Lebensmittelallergene	≥15 % CD 63 ⁺	
Bienen/Wespengift	≥10 %CD 63 ⁺	
Betalaktame	≥5 %CD 63 ⁺	SI ≥ 2
Schmerzmittel	≥5 %CD 63 ⁺	SI ≥ 2
Lebensmittelzusatzstoffe	≥5 %CD 63 ⁺	SI ≥ 2

SI = Stimulations Index: %CD63⁺ Allergen dividiert durch %CD63⁺ Patienten Background

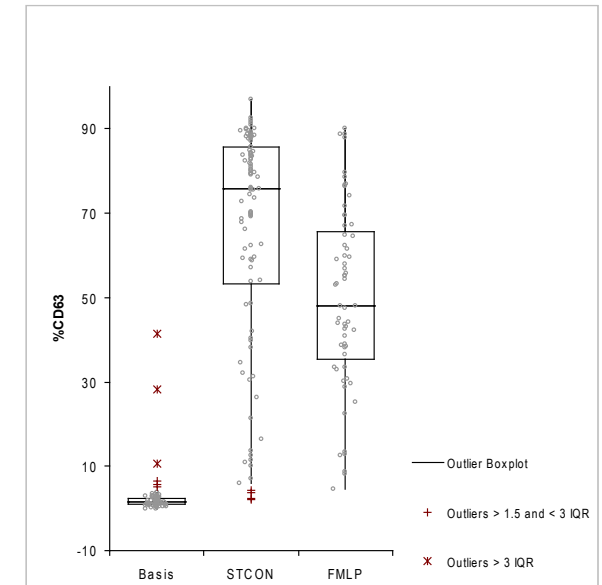


Abb 5: Box Plot Positive and negative Kontrollen von Blutspendern. Basis: Negativkontrolle (n=98); STCON: Positivkontrolle anti-FcεRI mAb (n=98); MLP: fMLP Positivkontrolle (n=61)

Bestellnummer:
FK-CCR 100 Tests



CAST® ist ein eingetragenes Warenzeichen von BÜHLMANN Laboratories AG



BÜHLMANN Laboratories AG
Germany/Switzerland
info@buhlmannlabs.ch
www.buhlmannlabs.ch
Phone +41 61 487 1212

BÜHLMANN in Austria GmbH
Austria
info@buhlmannlabs.at
www.buhlmannlabs.at
Phone +43 662 64 01 05